

19



SCHWEIZERISCHE EIDGENOSSENSCHAFT  
EIDGENÖSSISCHES INSTITUT FÜR GEISTIGES EIGENTUM

Erfindungspatent für die Schw iz und Liechtenst in  
Schweizerisch-liechtensteinischer Patentschutzvertrag vom 22. Dezember 1978

11 CH 689 672 A9

51 Int. Cl.<sup>6</sup>: C 07 K 014/435  
C 12 N 015/11  
C 07 K 016/18  
C 07 H 021/02  
A 61 K 038/17

## 12 PATENTSCHRIFT

21 Gesuchsnummer: 02312/97

22 Anmeldungsdatum: 01.10.1997

30 Priorität: 01.10.1996 US 08/724,643  
18.04.1997 US 08/844,419  
25.04.1997 US 08/846,017  
06.05.1997 US 08/851,843  
09.05.1997 US 08/854,050  
14.08.1997 US 08/911,312  
14.08.1997 US 08/912,951  
14.08.1997 US 08/915,503

24 Patent erteilt: 13.08.1999

45 Patentschrift  
veröffentlicht: 13.08.1999

48 Neu veröffentlicht: 29.02.2000

73 Inhaber:  
GERON CORPORATION, 230 Constitution Drive,  
Menlo Park, CA 94025 (US)  
UNIVERSITY TECHNOLOGY CORPORATION,  
3101 Iris Avenue, Suite 250, Boulder Co 80301 (US)

72 Erfinder:  
CECH, Thomas, R., 1545 Rockmont Circle,  
Boulder, CO 80303 (US)  
HARLEY, Calvin Bruce, 1730 University Avenue,  
Palo Alto, CA 94301 (US)  
ANDREWS, William, H., 6102 Park Avenue,  
Richmond, CA 94805 (US)  
Joachim Lingner, Pl. Croix-Blanche 25,  
1066 Epalinges (CH)  
Toru Nakamura, 4940 Thunderbird Circle, No. 204,  
Boulder, CO 80303 (US)  
Karen B. Chapman, 71 Cloud View Road,  
Sausalito, CA 94965 (US)  
Gregg B. Morin, 3407 Janice Way,  
Palo Alto, CA 94303 (US)

74 Vertreter:  
A. Braun, Braun, Héritier, Eschmann AG,  
Patentanwälte, Holbeinstrasse 36-38,  
4051 Basel (CH)

### 54 Katalytische Untereinheit menschlicher Telomerase.

57 Die Erfindung stellt Zusammensetzungen und Verfahren bereit, die sich auf menschliche Telomerase-reverse Transkriptase (hTRT), die katalytische Protein-Untereinheit von menschlicher Telomerase, beziehen. Die erfindungsgemässen Polynucleotide und Polypeptide sind nützlich für die Diagnose, Prognose und zur Behandlung von menschlichen Krankheiten, zur Veränderung der Proliferationskapazität von Zellen und Organismen zur Identifizierung und zum Screenen von Verbindungen und Behandlungen, die für die Behandlung von Krankheiten, wie z.B. Krebs, von Nutzen sind.



## Beschreibung

Die vorliegende Erfindung betrifft neue Nucleinsäuren und Polypeptide, die die katalytische Untereinheit von Telomerase codieren. Insbesondere betrifft die vorliegende Erfindung die katalytische Untereinheit von menschlicher Telomerase. Die Erfindung stellt Verfahren und Zusammensetzungen bereit, die die Medizin, Molekularbiologie, Chemie, Pharmakologie und medizinische, diagnostische und prognostische Verfahren betreffen.

Die folgende Diskussion soll den Leser in das Gebiet, auf das sich die vorliegende Erfindung bezieht, einführen. Das Zitieren verschiedener Literaturstellen in diesem Abschnitt soll nicht als ein Eingeständnis einer Vorwegnahme der Erfindung verstanden werden.

Es ist schon lange bekannt, dass die vollständige Replikation der Enden von eukaryotischen Chromosomen spezialisierte Zellbestandteile erfordert (Watson, *Nature New Biol.* 239 (1972), 197 und Olovnikov, *J. Theor. Biol.* 41 (1973), 181). Die Replikation eines linearen DNA-Strangs durch übliche DNA-Polymerasen erfordert einen RNA-Primer und sie kann nur in 5'-3'-Richtung fortschreiten. Bei Entfernung der an das äussere 5'-Ende chromosomaler eukaryotischer DNA-Stränge gebundene RNA wird eine Lücke eingeführt, was zu einer fortschreitenden Verkürzung der Tochterstränge bei jeder Replikationsrunde führt. Diese Verkürzung von Telomeren, die die an den Enden von Chromosomen physisch lokalisierten Protein/DNA-Strukturen darstellen, scheint der Grund für das Phänomen der zellulären Seneszenz oder Alterung (siehe z.B. Goldstein, *Science* 249 (1990), 1129; Martin et al., *Lab. Invest.* 23 (1979), 86; Goldstein et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 64 (1969), 155 und Schneider und Mitsui, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 73 (1976), 3584) normaler menschlicher somatischer Zellen in vitro und in vivo zu sein.

Die Länge und Integrität von Telomeren steht somit mit dem Eintritt einer Zelle in einen seneszenten Status (d.h. den Verlust der Proliferationsfähigkeit) in Zusammenhang. Da rüber hinaus dürfte die Fähigkeit einer Zelle die Telomerlänge zu bewahren (oder zu steigern) es der Zelle erlauben, der Seneszenz zu entgehen, d.h. unsterblich zu werden.

Die Struktur von Telomeren und Telomer-DNA wurde in zahlreichen Systemen untersucht (siehe z.B. Harley und Villeponteau, *Curr. Opin. Genet. Dev.* 5 (1995), 249). In den meisten Organismen besteht Telomer-DNA aus einem Tandemarray von sehr einfachen Sequenzen; in Menschen und anderen Vertebraten besteht Telomer-DNA aus hunderten bis tausenden von Tandemwiederholungseinheiten der Sequenz TTAGGG. Verfahren zur Bestimmung und Modulierung der Telomerlänge in Zellen sind in den PCT-Veröffentlichungen WO 93/23 572 und WO 96/41 016 beschrieben.

Die Wahrung von Telomeren ist eine Funktion einer Telomerspezifischen DNA-Polymerase, die als Telomerase bekannt ist. Telomerase ist ein Ribonucleoprotein (RNP), das einen Anteil seiner RNA-Einheit als eine Matrize für die Synthese der DNA-Telomer-Wiederholungseinheiten verwendet (Morin, *Eur. J. Cancer* 33 (1997), 750; Yu et al., *Nature* 344 (1990) 126; Singer und Gottschling, *Science* 266 (1994), 404; Autexier und Greider, *Genes Develop.* 8 (1994), 563; Gilley et al., *Genes Develop.* 9 (1995), 2214; Mc Eachern und Blackburn, *Nature* 367 (1995), 403; Blackburn, *Ann. Rev. Biochem.* 61 (1992), 113; Greider, *Ann. Rev. Biochem.* 65 (1996), 337). Die RNA-Bestandteile von menschlichen und anderen Telomerasen wurden cloniert und charakterisiert (siehe die PCT-Veröffentlichung WO 96/01835 und Feng et al., *Science* 269 (1995), 1236). Die Charakterisierung der Proteinbestandteile von Telomerase war jedoch schwierig. Dies rührt teilweise daher, dass es sich als schwierig herausgestellt hat, Telomerase-RNP zu reinigen, das in Zellen, in denen es exprimiert wird, nur in äusserst geringen Konzentrationen vorhanden ist. Beispielsweise nahm man an, dass menschliche Zellen, von denen man weiss, dass sie hohe Spiegel an Telomerase-Aktivität exprimieren, lediglich etwa 100 Enzymmoleküle pro Zelle besitzen.

Übereinstimmend mit der Beziehung von Telomeren und Telomerase mit der Proliferationsfähigkeit einer Zelle (d.h. der Fähigkeit einer Zelle, sich unbegrenzt zu teilen), wurde Telomerase-Aktivität in unsterblichen Zelllinien und in ausgesprochen unterschiedlichen Arten von Tumorgeweben nachgewiesen, sie wurde jedoch nicht in normalen somatischen Zellkulturen oder normalen Geweben in Nachbarschaft eines Tumors (siehe US-Patente mit den Nummern 5 629 154; 5 489, 508; 5 648 215 und 5 639 613; siehe auch Morin, *Cell* 59 (1989) 521; Shay und Bacchetti, *Eur. J. Cancer* 33 (1997), 78 7; Kim et al., *Science* 266 (1994), 2011; Counter et al., *EMBO J.* 11 (1992), 1921; Counter et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91 (1994), 2900 und Counter et al., *J. Virol.* 68 (1994), 3410) nachgewiesen (d.h. war nicht vorhanden oder unter der Nachweisgrenze des Assays). Darüber hinaus wurde über einen Zusammenhang zwischen dem Spiegel an Telomeraseaktivität in einem Tumor und des wahrscheinlichen klinischen Verlaufs der Krankheit des Patienten berichtet (z.B. US-Patent Nr. 5,639,613, a.a.O., und Langford et al., *Hum. Pathol.* 28 (1997), 416). Telomerase-Aktivität wurde auch in menschlichen Keimzellen, proliferierenden Stammzellen oder Nachkommen davon und aktivierten Lymphocyten nachgewiesen. In somatischen Stammzellen oder den Nachkommen davon und in aktivierten Lymphocyten ist die Telomerase-Aktivität typischerweise entweder sehr gering oder nur transient exprimiert (siehe Chiu et al., *Stem Cells* 14 (1996), 239, Bodnar et., *Exp. Cell Res.* 228 (1996), 58 und Taylor et al., *J. Invest. Dermatology* 106 (1996), 759).

Menschliche Telomerase ist ein ideales Ziel für die Diagnose und Behandlung menschlicher Krankheiten, die sich auf zelluläre Proliferation und Seneszenz, wie beispielsweise Krebs, beziehen. Verfah-

ren zur Diagnose und Behandlung von Krebs und anderen mit Telomerase in Zusammenhang stehenden Krankheiten in Menschen sind in den US-Patenten Nr. 5 489 508, 5 639 613 und 5 645 986 beschrieben. Verfahren zur Vorhersage des Fortschreitens eines Tumors durch Beobachtung von Telomerase sind in dem US-Patent Nr. 5 639 613 beschrieben. Das Auffinden und die Charakterisierung der katalytischen Protein-Untereinheit menschlicher Telomerase würde zusätzliche nützliche Assays für Telomerase und für die Diagnose und Therapie von Krankheiten bereitstellen. Darüber hinaus würde es die Clonierung und die Bestimmung der Primärsequenz der katalytischen Protein-Untereinheit erlauben, wirksamere Therapien für menschlichen Krebs und andere Krankheiten, die mit der Proliferationsfähigkeit und Seneszenz von Zellen zusammenhängen, bereitzustellen.

Die vorliegende Erfindung stellt eine isolierte, im wesentlichen reine oder rekombinante Proteinpräparation eines Telomerase-reverse Transkriptase-Proteins oder einer Variante oder eines Fragments davon bereit. In einer Ausführungsform weist das Protein folgende Aminosäuresequenz auf:

Trp-R<sub>1</sub>-X<sub>7</sub>-R<sub>1</sub>-R<sub>1</sub>-R<sub>2</sub>-X-Phe-Phe-Tyr-X-Thr-Glu-X<sub>8,9</sub>-R<sub>3</sub>-R<sub>3</sub>-Arg-R<sub>4</sub>-X<sub>2</sub>-Trp

wobei X eine beliebige Aminosäure ist und eine tiefgestellte Zahl sich auf die Anzahl von aufeinanderfolgenden Resten bezieht, R<sub>1</sub> Leucin ist oder Isoleucin, R<sub>2</sub> Glutamin oder Arginin, R<sub>3</sub> Phenylalanin oder Tyrosin und R<sub>4</sub> Lysin oder Histidin. In einer Ausführungsform hat das Protein eine Sequenz von menschlicher TRT. In anderen Ausführungsformen betrifft die Erfindung Peptide und Polypeptide, die mit einer Untersequenz solcher Proteine im wesentlichen Sequenzidentität gemeinsam haben.

In einer verwandten Ausführungsform stellt die Erfindung eine isolierte, im wesentlichen reine oder rekombinante Nucleinsäure bereit, die ein Telomerase-reverse Transkriptase-Protein codiert. In einer Ausführungsform hat das Protein die folgende Aminosäuresequenz:

Trp-R<sub>1</sub>-X<sub>7</sub>-R<sub>1</sub>-R<sub>1</sub>-R<sub>2</sub>-X-Phe-Phe-Tyr-X-Thr-Glu-X<sub>8,9</sub>-R<sub>3</sub>-R<sub>3</sub>-Arg-R<sub>4</sub>-X<sub>2</sub>-Trp.

In einer Ausführungsform hat die Nucleinsäure eine Sequenz menschlicher TRT. In weiteren Ausführungsformen betrifft die Erfindung Oligonucleotide und Polynucleotide, die mit einer Untereinheit solcher Nucleinsäuren wesentliche Sequenzidentität gemeinsam haben.

Ein erfindungsgemässer Aspekt betrifft menschliche Telomerase-reverse Transkriptase (hTRT). Somit stellt die Erfindung in einer Ausführungsform eine isolierte, im wesentlichen reine oder rekombinante Proteinpräparation eines menschlichen Telomerase-reverse Transkriptase (hTRT)-Proteins oder einer Variante oder eines Fragments davon bereit.

In einer Ausführungsform ist das Protein durch eine Aminosäure gekennzeichnet mit mindestens etwa 75% oder mindestens etwa 80% Sequenzidentität zu dem hTRT-Protein von SEQ. ID. Nr. 2 (Fig. 17) oder eine Variante oder eines Fragments davon. In einer verwandten Ausführungsform hat das hTRT-Protein die Sequenz von SEQ. ID. Nr. 2. In einigen Ausführungsformen weist das Protein eine oder mehrere Telomerase-Aktivitäten auf, beispielsweise katalytische Aktivität. In einer Ausführungsform weist das hTRT-Proteinfragment mindestens 6 Aminosäurereste auf.

Die Erfindung stellt auch eine, ein hTRT-Protein und eine RNA umfassende Zusammensetzung bereit. Die RNA kann eine Telomerase-RNA sein, beispielsweise eine RNA menschlicher Telomerase. In einer Ausführungsform bilden das hTRT-Protein und die RNA menschlicher Telomerase einen Ribonucleoproteinkomplex mit einer Telomerase-Aktivität.

Ein erfindungsgemässer Aspekt betrifft die Bereitstellung isolierter menschlicher Telomerase, beispielsweise einer im wesentlichen reinen menschlichen Telomerase, die menschliche Telomerase-reverse Transkriptase (hTRT) und menschliche Telomerase RNA (hTR) umfasst. In einer Ausführungsform hat die Telomerase eine Reinheit von mindestens etwa 95%. Die Telomerase kann aus einer Zelle isoliert sein.

Ein weiterer erfindungsgemässer Gesichtspunkt betrifft die Bereitstellung eines isolierten, synthetischen, im wesentlichen reinen oder rekombinanten Polynucleotids, das eine ein hTRT-Protein codierende Nucleinsäuresequenz umfasst. In einer Ausführungsform hat das Polynucleotid eine Nucleotidsequenz, die ein hTRT-Protein codiert, das eine in SEQ. ID. Nr. 2 angegebene Aminosäuresequenz hat, oder eine Sequenz, die eine oder mehrere konservative Substitutionen in dieser Aminosäuresequenz umfasst. Ein verwandter Aspekt betrifft die Bereitstellung eines Polynucleotids, das unter stringenten Bedingungen mit einem Polynucleotid mit der Sequenz von SEQ. ID. Nr. 1 hybridisiert. In einer weiteren verwandten Ausführungsform hat die Nucleotidsequenz des Polynucleotids eine kleinste Summenwahrscheinlichkeit von weniger als etwa 0,5 im Vergleich zu einer in SEQ. ID. Nr. 1 angegebenen Nucleotidsequenz mittels des BLAST-Algorithmus unter Verwendung von Voreinstellungsparametern.

Ein weiterer erfindungsgemässer Aspekt betrifft die Bereitstellung eines Polynucleotids mit einer Promotorsequenz, die mit der das hTRT-Protein codierenden Sequenz funktionell verknüpft ist. Der Promotor kann ein Promotor sein, der nicht dem natürlich vorkommenden hTRT-Promotor entspricht. Ein verwandter erfindungsgemässer Gesichtspunkt betrifft die Bereitstellung eines Expressionsvektors, der das hTRT-Polynucleotid umfasst.

Die Erfindung stellt auch ein isoliertes, synthetisches, im wesentlichen reines oder rekombinantes Polynucleotid bereit, das eine Länge von mindestens 10 Nucleotiden aufweist und eine aufeinanderfolgende Sequenz von mindestens 10 Nucleotiden umfasst die zu einer aufeinanderfolgenden Sequenz in ei-

nem natürlich vorkommenden hTRT-Gen oder hTRT-mRNA identisch oder genau komplementär ist. In einigen Ausführungsformen ist das Polynucleotid eine RNA, eine DNA, oder es enthält ein oder mehrere nicht natürlich vorkommende, synthetische Nucleotide. In einer Ausführungsform ist das Polynucleotid identisch oder genau komplementär zu der aufeinanderfolgenden Sequenz von mindestens 10 aufeinanderfolgenden Nucleotiden in einem natürlich-vorkommenden hTRT-Gen oder einer hTRT-mRNA. Beispielsweise kann das Polynucleotid ein «antisense»-Polynucleotid sein. In einer anderen Ausführungsform umfasst das antisense-Polynucleotid mindestens etwa 20 Nucleotide.

Die Erfindung stellt auch ein Verfahren zur Herstellung rekombinanter Telomerase durch Inkontaktbringen eines rekombinanten hTRT-Proteins mit einem Telomerase-RNA-Bestandteil unter solchen Bedingungen bereit, dass das rekombinante Protein und der Telomerase-RNA-Bestandteil zur Bildung eines Telomerase-Enzyms assoziieren, das die Hinzufügung von Nucleotiden zu einem Telomerase-Substrat katalysieren kann. In einer Ausführungsform hat das hTRT-Protein die Sequenz von SEQ. ID. Nr. 2. Das hTRT-Protein kann in einem in vitro-Expressionssystem hergestellt und mit einer Telomerase-RNA vermischt werden; in einer anderen Ausführungsform wird die Telomerase-RNA in dem in vitro-Expressionssystem coexprimiert. In einer Ausführungsform ist die Telomerase-RNA menschliche Telomerase-RNA. In einer alternativen Ausführungsform geschieht das Inkontaktbringen in einer Zelle, beispielsweise einer menschlichen Zelle. In einer Ausführungsform weist die Zelle keine Telomeraseaktivität vor dem Inkontaktbringen von hTRT und der RNA eines hTRT-Polynucleotids (oder der Einführung z.B. durch Transfektion) auf. In einer Ausführungsform wird die Telomerase-RNA natürlicherweise von der Zelle exprimiert.

Die Erfindung stellt auch eine Zelle bereit, beispielsweise eine menschliche Zelle, Mauszelle oder Hegefzelle, die die erfindungsgemässen rekombinanten Polynucleotide enthält, beispielsweise ein Polynucleotid mit einer mit einem Promotor funktionell verknüpften, ein hTRT-Protein codierenden Sequenz. Hinsichtlich bestimmter Aspekte ist die Zelle eine Vertebrazelle, beispielsweise eine Zelle eines Säugers, z.B. eines Menschen, und weist eine erhöhte Proliferationsfähigkeit relativ zur Zelle auf, die ansonsten identisch ist, jedoch nicht das rekombinante Polynucleotid umfasst, oder sie weist einen erhöhten Telomerase-Aktivitätsspiegel auf, relativ zu einer Zelle, die ansonsten identisch ist, jedoch nicht rekombinante Polynucleotide umfasst. In einigen Ausführungsformen ist die Zelle unsterblich.

Verwandte erfindungsgemässe Ausführungsformen betreffen die Bereitstellung von Organismen und Zellen, die ein Polynucleotid umfassen, das ein menschliches Telomerase-reverse Transkriptase-Polypeptid ist. Dazu zählen ein transgener nicht-menschlicher Organismus, wie beispielsweise Hefe, eine Pflanze oder Bakterium oder ein Tier, beispielsweise eine Maus. Die Erfindung stellt auch transgene Tiere und Zellen bereit, bei denen ein hTRT-Gen deletiert wurde («knockedout») oder so mutiert wurde, dass das Gen ein natürlich vorkommendes hTRT-Genprodukt nicht exprimiert. Somit hat in alternativen Ausführungsformen das transgene Tier ein mutiertes Telomerasegen, ist ein hinsichtlich einer Telomerase-Aktivität defizientes Tier, ist ein Tier, dessen TRT-Defizienz das Ergebnis eines mutierten Gens ist, das eine TRT mit einem herabgesetzten Spiegel an Telomerase-Aktivität im Vergleich zu einem Wildtyp-TRT besitzt oder ein Tier mit einem mutierten TRT-Gen mit einer oder mehreren Mutationen, wozu «missense» Mutationen, «nonsense»-Mutationen, Insertionen und Deletionen zählen.

Die Erfindung stellt auch einen isolierten oder rekombinanten Antikörper oder ein Fragment davon bereit, die an hTRT-Protein spezifisch binden. In einer Ausführungsform bindet der Antikörper mit einer Affinität von mindestens etwa  $10^9 \text{M}^{-1}$ . Der Antikörper kann eine monoclonale oder polyclonale Zusammensetzung, beispielsweise ein polyclonales Antiserum, sein. Ein verwandter erfindungsgemässer Aspekt betrifft die Bereitstellung einer Zelle, die den Antikörper sezernieren kann, beispielsweise ein Hybridom.

Die Erfindung stellt auch ein Verfahren zum Nachweis zur Verfügung, ob eine Verbindung oder eine Behandlung ein Modulator einer reversen Transkriptase-Aktivität von Telomerase oder der hTRT-Expression ist durch den Nachweis oder die Überwachung einer Veränderung in der Aktivität oder Expression in einer Zelle, einem Tier oder einer Zusammensetzung, die ein hTRT-Protein oder entsprechendes Polynucleotid umfasst, nach Verabreichung der Verbindung oder der Behandlung. In einer Ausführungsform beinhaltet das Verfahren die folgenden Schritte: Bereitstellung einer TRT-Zusammensetzung, Inkontaktbringen der TRT mit der Testverbindung und Messung der Aktivität der TRT, wobei eine Veränderung in der TRT-Aktivität in Gegenwart der Testverbindung ein Indikator dafür ist, ob die Testverbindung TRT-Aktivität moduliert. In bestimmten Ausführungsformen ist die Zusammensetzung eine Zelle, ein Organismus, ein transgener Organismus oder ein in vitro-System, beispielsweise ein Expressionssystem, das ein hTRT-Polypeptid codierendes rekombinantes Polynucleotid enthält. Somit kann die menschliche Telomerase-reverse Transkriptase dieses Verfahrens ein Produkt einer in vitro-Expression sein. In verschiedenen Ausführungsformen kann der Nachweis einer Telomerase-Aktivität oder -Expression dadurch erfolgen, dass eine Veränderung in der Häufigkeit eines hTRT-Genprodukts dadurch nachgewiesen wird, dass der Einbau einer Nucleotidmarkierung in ein Substrat für Telomerase überwacht wird, die Hybridisierung einer Sonde mit einem verlängerten Telomerase-Substrat, die Amplifikation eines verlängerten Telomerase-Substrats, die Telomerlänge einer der Testverbindung ausgesetzten Zelle und der Verlust der Fähigkeit der Telomerase an ein Chromosom zu binden oder durch die Messung der Anreicherung oder des Verlusts einer Telomerstruktur.

Ein erfindungsgemässer Aspekt betrifft die Bereitstellung eines Verfahrens zur Nachweis eines menschlichen Telomerase-reverse Transkriptase (hTRT)-Genprodukts in einer biologischen Probe durch



Inkontaktbringen der biologischen Probe mit einer Sonde, die das Genprodukt spezifisch bindet, wobei die Sonde und das Genprodukt einen Komplex bilden, und durch den Nachweis des Komplexes, wobei das Vorhandensein des Komplexes mit dem Vorhandensein des hTERT-Genprodukts in der biologischen Probe korreliert. Das Genprodukt kann RNA, DNA oder ein Polypeptid sein. Zu den Beispielen für Sonden, die zum Nachweis verwendet werden können, zählen, jedoch ohne Beschränkung darauf, Nucleinsäuren und Antikörper.

In einer Ausführungsform ist das Genprodukt eine Nucleinsäure, die durch Amplifikation des Gens und Nachweis des Amplifikationsprodukts nachgewiesen wird, wobei das Vorhandensein des Komplexes oder des Amplifikationsprodukts mit dem Vorhandensein des hTERT-Genprodukts in der biologischen Probe korreliert.

In einer Ausführungsform ist die biologische Probe von einem Patienten beispielsweise einem menschlichen Patienten. In einer weiteren Ausführungsform enthält die biologische Probe mindestens eine Zelle aus einer in vitro-Zellkultur, beispielsweise einer Kultur menschlicher Zellen.

Die Erfindung stellt ferner ein Verfahren zum Nachweis des Vorhandenseins mindestens einer unsterblichen oder Telomerase-positiven menschlichen Zelle in einer menschlichen Zellen umfassenden biologischen Probe bereit; wobei die menschliche Zellen umfassende biologische Probe erhalten wird und das Vorhandensein einer Zelle mit einem hohen Spiegel eines hTERT-Genprodukts in der Probe nachgewiesen wird, wobei das Vorhandensein einer Zelle mit einem hohen Spiegel an dem hTERT-Genprodukt mit dem Vorhandensein von unsterblichen oder Telomerase-positiven Zellen in der biologischen Probe korreliert. Die Erfindung stellt auch ein Verfahren bereit zur Diagnose eines mit Telomerase in Zusammenhang stehenden Zustands in einem Patienten durch Gewinnung einer Zelle oder einer Gewebeprobe von dem Patienten, Bestimmung der Menge eines menschlichen Telomerase-reverse Transkriptase (hTERT)-Genprodukts in der Zelle oder dem Gewebe und dem Vergleich der Menge des hTERT-Genprodukts in der Zelle oder dem Gewebe mit der Menge in einer gesunden Zelle oder einem gesunden Gewebe des gleichen Typs, wobei eine unterschiedliche Menge des hTERT-Genprodukts in der Probe von dem Patienten im Vergleich zu der gesunden Zelle oder im gesunden Gewebe ein diagnostisches Anzeichen für einen mit Telomerase in Zusammenhang stehenden Zustand ist. In einer Ausführungsform ist der mit Telomerase in Zusammenhang stehende Zustand Krebs.

Die Erfindung stellt ferner ein Verfahren bereit zur Diagnose von Krebs in einem Patienten durch Gewinnung einer Probe von dem Patienten und den Nachweis eines menschlichen Telomerase-reverse Transkriptase-(hTERT)-Genprodukts in der Probe von dem Patienten, wobei der Nachweis des hTERT-Genprodukts in der Probe mit einer Diagnose von Krebs korreliert.

Die Erfindung stellt ferner ein Verfahren bereit zur Diagnose von Krebs in einem Patienten durch Gewinnung einer Patientenprobe, Bestimmung der Menge des menschlichen Telomerase-reverse Transkriptase (hTERT)-Genprodukts in der Patientenprobe und den Vergleich der Menge des hTERT-Genprodukts mit einem normalen Wert oder Kontrollwert, wobei eine Menge des hTERT-Genprodukts in dem Patienten, die in dem Vergleich zu dem Normalwert oder Kontrollwert grösser ist, ein diagnostisches Anzeichen für Krebs ist.

Die Erfindung stellt auch ein Verfahren bereit zur Diagnose von Krebs in einem Patienten durch Gewinnung einer Patientenprobe, die mindestens eine Zelle enthält, Bestimmung der Menge des hTERT-Genprodukts, in einer Zelle in der Probe und den Vergleich der Menge des hTERT-Genprodukts in der Zelle mit einem für die Zellen normalen Wert, wobei eine Menge des hTERT-Genprodukts die über dem Normalwert liegt, ein diagnostisches Anzeichen für Krebs ist. In einer Ausführungsform wird davon ausgegangen, dass die Probe mindestens eine maligne Zelle enthält.

Die Erfindung stellt ausserdem ein Verfahren zur Bereitstellung einer Prognose für einen Krebspatienten bereit, wobei die Menge des hTERT-Genprodukts in einer von dem Patienten erhaltenen Krebszelle bestimmt wird und die Menge von hTERT in der Krebszelle mit einem prognostischen Wert für hTERT pro Krebszelle, konsistent mit einer Prognose hinsichtlich Krebs ist, wobei eine hTERT-Menge pro Zelle in der Probe, die bei dem prognostischen Wert liegt, die spezielle Prognose bereitstellt.

Die Erfindung stellt ausserdem ein Verfahren bereit zur Überwachung der Wirksamkeit einer Antikrebsbehandlung, die Proliferationskapazität von Krebszellen in einem Patienten herabzusetzen, dadurch, dass zuerst eine Messung der Menge eines hTERT-Genprodukts in mindestens einer Krebszelle von dem Patienten durchgeführt wird, eine zweite Messung hinsichtlich des Spiegels an hTERT-Genprodukts in mindestens einer Krebszelle des Patienten durchgeführt wird, wobei die Antikrebsbehandlung dem Patienten vor der zweiten Messung oder zur gleichen Zeit verabreicht wird und durch den Vergleich der ersten mit der zweiten Messung, wobei ein niedriger Spiegel an hTERT-Genprodukt in der zweiten Messung mit der Wirksamkeit einer Antikrebsbehandlung korreliert, die Proliferationskapazität von Krebszellen in dem Patienten herabzusetzen.

Die Erfindung stellt auch Kits für den Nachweis eines hTERT-Gens oder Genprodukts zur Verfügung. In einer Ausführungsform enthält der Kit einen Behälter, der ein Molekül umfasst, ausgewählt aus einer hTERT-Nucleinsäure oder einer Untersequenz davon, ein hTERT-Polypeptid oder eine Untersequenz davon und einen anti-hTERT-Antikörper. Die Erfindung stellt auch Behandlungsverfahren für menschliche Krankheiten zur Verfügung. Ein erfindungsgemässer Aspekt betrifft die Bereitstellung eines Verfahrens zur Steigerung der Proliferationskapazität einer Vertebratenzelle, beispielsweise einer Säugerzelle, durch Einführung eines rekombinanten Polynucleotids in die Zelle, wobei das Polynucleotid eine Sequenz

umfasst, die ein menschliches Telomerase-reverse Transkriptase (hTERT)-Polypeptid umfasst. In einer Ausführungsform hat das hTERT-Polypeptid eine Sequenz von SEQ. ID. Nr. 2 (Fig. 17). In einer Ausführungsform ist die Sequenz mit einem Promotor funktionell verknüpft. In einer Ausführungsform weist die hTERT katalytische Aktivität von Telomerase auf. In einer Ausführungsform ist die Zelle menschlich, beispielsweise eine Zelle in einem menschlichen Patienten.

In einer alternativen Ausführungsform wird die Zelle in vitro kultiviert. In einer verwandten Ausführungsform wird die Zelle in einen menschlichen Patienten eingeführt.

Die Erfindung stellt ferner ein Verfahren bereit zur Behandlung einer menschlichen Krankheit durch Einführung eines rekombinanten hTERT-Polynucleotids in mindestens eine Zelle in einem Patienten. In einer Ausführungsform wird ein Vektor für Gentherapie verwendet. In einer verwandten Ausführungsform besteht das Verfahren ferner in der Einführung eines Polynucleotids in die Zelle, das eine menschliche Telomerase-RNA codierende Sequenz umfasst, beispielsweise ein hTERT-Polynucleotid, das mit einem Promotor funktionell verknüpft ist.

Die Erfindung stellt auch ein Verfahren bereit zur Steigerung der Proliferationsfähigkeit einer Vertebratenzelle, wobei das Verfahren die Einführung einer wirksamen Menge eines menschlichen Telomerase-reverse Transkriptase (hTERT)-Polypeptids in die Zelle umfasst. In einer Ausführungsform hat das hTERT-Polypeptid katalytische Aktivität von Telomerase. Die Erfindung stellt ferner Zellen und Nachkommen der Zellen mit erhöhter Proliferationskapazität bereit.

Die Erfindung stellt auch Arzneimittel bereit, die einen pharmazeutisch verträglichen Träger enthalten und ein Molekül ausgewählt aus: einem hTERT-Polypeptid, einem ein hTERT-Polypeptid codierenden Polynucleotid und einer hTERT-Nucleinsäure oder einer Untersequenz davon.

Die Erfindung stellt auch ein Verfahren bereit zur Behandlung eines Zustands, der mit einem erhöhten Spiegel an Telomerase-Aktivität innerhalb einer Zelle assoziiert ist, wobei das Verfahren die Einführung einer therapeutisch wirksamen Menge eines Inhibitors von Telomerase-Aktivität in die Zelle umfasst, wobei der Inhibitor ein hTERT-Polypeptid oder ein hTERT-Polynucleotid ist. In einer Ausführungsform ist der Inhibitor ein Polypeptid, das die Sequenz von SEQ. ID. Nr. 2 oder 4 oder eine Untersequenz davon umfasst. In weiteren Ausführungsformen hemmt das Polypeptid eine TRT-Aktivität, beispielsweise die Bindung endogener TRT an Telomerase-RNA.

Die Erfindung stellt auch ein Vakzin bereit, das ein hTERT-Polypeptid und ein Adjuvans umfasst.

#### Beschreibung der Figuren

Fig. 1

zeigt hochkonservierte Reste in TRT-Motiven von Menschen, *S. pombe* (tez1), *S. cerevisiae* (EST2) und *Euplotes aediculatus* (p123). Identische Aminosäuren sind mit einem Sternchen (\*) gekennzeichnet, während ähnliche Aminosäurereste durch einen Punkt (•) gekennzeichnet sind. Motiv «0» in der Figur wird auch Motiv T genannt; Motiv «3» wird auch Motiv A genannt.

Fig. 2

zeigt die Lage Telomerase-spezifischer Motive und RT-spezifischer Sequenzmotive von Telomerase-Proteinen und anderen reversen Transkriptasen. Die Lage des Telomerase-spezifischen Motivs T und der konservierten RT-Motive 1, 2 und A-E sind durch gefüllte Kästchen gekennzeichnet. Das mit einem offenen Rechteck gekennzeichnete HIV-1 RT kennzeichnet den in Fig. 3 gezeigten Anteil dieses Proteins.

Fig. 3

zeigt die Kristallstruktur der p66-Untereinheit von HIV-1-reverse Transkriptase («Brookhaven code» 1HNV). Die Ansicht ist, vom rechten Handrücken aus gesehen, dargestellt, damit alle Motive erkennbar sind.

Fig. 4

zeigt mehrere Sequenzausrichtungen von Telomerase-RTs (*Sp\_Trt1p*, *S. pombe* TRT (hier auch mit «tez1p» bezeichnet); *bTERT*, menschliche TRT; *Ea\_p123*, *Euplotes* p123; *Sc\_Est2p*, *S. cerevisiae* Est2P) und Mitglieder anderer RT-Familien (*S\_a1*, Cytochrom-oxidase Gruppe II Intron I-codiertes Protein von *S. cerevisiae*-Mitochondrien, *Dm\_TART*, reverse Transkriptase von *Drosophila melanogaster* TART-nicht-LTR-Retrotransposon-Element); HIV-1, reverse Transkriptase von menschlichem HIV). TRT con und RT con repräsentieren «Consensus»-Sequenzen für Telomerase-RTs und nicht-Telomerase-RTs. Aminosäuren sind gekennzeichnet mit einem h, hydrophob; p, polar; c, geladen. Dreiecke bezeichnen Reste, die innerhalb der Telomerase-Proteine konserviert sind, in anderen RTs jedoch unterschiedlich sind. Die dicke Linie unter Motiv E bezeichnet den «Primergriff» («primer grip»)-Bereich.

Fig. 5

zeigt die Expression von hTERT-RNA in Telomerase-negativen sterblichen Zellstämmen und Telomerase-positiven unsterblichen Zelllinien, wie in Beispiel 2 beschrieben.

Fig. 6

zeigt einen möglichen phylogenetischen Stammbaum von Telomerasen und Retroelementen mit RNA-abhängigen RNA-Polymerasen als Wurzel.

Fig. 7

zeigt eine Restriktionskarte des lambda-Clons G.φ5.

- Fig. 8  
zeigt ein Karte von Chromosom Sp mit der Lage des STS-Markers D5S678 (der in der Näh des hTERT-Gens lokalisiert ist).
- Fig. 9  
5 zeigt die Konstruktion eines hTERT-Promotor-Reporterplasmids.
- Fig. 10  
(zwei Seiten) zeigt die in vitro-Coexpression von hTERT und hTR zur Herstellung katalytisch aktiver menschlicher Telomerase.
- Fig. 11  
10 (zwei Seiten) zeigt die Ausrichtung von Sequenzen von vier TRT-Proteinen und interessierende Motive sind gekennzeichnet. TRT con bezeichnet eine TRT-«Consensus»-Sequenz. RT con bezeichnet «Consensus»-Reste bei anderen reversen Transkriptasen. «Consensus»-Reste mit Grossbuchstaben kennzeichnen absolute Konservierung in TRT-Proteinen.
- Fig. 12  
15 zeigt eine Topoisomerase II-Spaltstelle und NFκB-Bindungsstellen-Motive in einem hTERT-Intron, wobei die gezeigte Sequenz SEQ. ID. Nr. 7 (Fig. 12) entspricht.
- Fig. 13  
(zwei Seiten) zeigt die Sequenz der DNA, die die Euplotes 123 kD-Telomerase-Proteinuntereinheit codiert (Euplotes TRT-Protein).
- Fig. 14  
20 zeigt die Aminosäuresequenz der Euplotes 123 kD-Telomerase-Proteinunterheit (Euplotes TRT-Protein).
- Fig. 15  
(vierzehn Seiten) zeigt die DNA- und Aminosäuresequenzen der katalytischen Untereinheit der *S. pombe*-Telomerase (*S. pombe*-TRT).
- Fig. 16  
25 (zwei Seiten) zeigt die hTERT-cDNA-Sequenz, wobei die gezeigte Sequenz SEQ. ID. Nr. 1 entspricht.
- Fig. 17  
zeigt das hTERT-Protein, codiert durch die cDNA von Fig. 16. Die gezeigte Proteinsequenz entspricht SEQ. ID. Nr. 2.
- Fig. 18  
30 zeigt die Sequenz des Clons 712562, wobei die gezeigte Sequenz SEQ. ID. Nr. 3 entspricht.
- Fig. 19  
zeigt ein Protein mit 259 Resten, das von dem Clon 712562 codiert wird, wobei die gezeigte Sequenz SEQ. ID. Nr. 10 entspricht.
- Fig. 20  
35 (sieben Seiten) zeigt die Sequenz einer Nucleinsäure mit einem offenen Leserahmen, die eine Δ182-Polypeptidvariante codiert, wobei die gezeigte Sequenz SEQ. ID. Nr. 4 entspricht. Diese Figur zeigt auch die Aminosäuresequenz dieser Δ182-Polypeptidvariante, wobei die gezeigte Aminosäuresequenz SEQ. ID. Nr. 5 entspricht.
- Fig. 21  
40 (sechs Seiten) zeigt die Sequenz eines genomischen hTERT-Clons, wobei die gezeigte Sequenz SEQ. ID. Nr. 6 entspricht. «Consensus»-Motive und Elemente sind angegeben, dazu gehören auch Sequenzen, die charakteristisch sind für eine Topoisomerase II-Spaltstelle, NFκB-Bindungsstellen, eine Alu-Sequenz und andere Sequenzelemente.
- Fig. 22  
45 zeigt die Auswirkung einer Mutation des TRT-Gens in Hefe, wie in Beispiel 1 beschrieben.
- Fig. 23  
zeigt die Sequenz von EST AA281296, die SEQ. ID. Nr. 8 entspricht.
- Fig. 24  
50 zeigt die Sequenz der 182 Basenpaare, die in Clon 712562 deletiert sind, wobei die gezeigte Sequenz SEQ. ID. Nr. 9 entspricht.
- Fig. 25  
zeigt die Ergebnisse eines Assays auf Telomerase-Aktivität von BJ-Zellen, die mit einem ein hTERT-Protein codierenden Expressionsvektor (pGRN133) oder einem Kontrollplasmid (pBBS212) transfiziert wurden, wie in Beispiel 13 beschrieben.
- Fig. 26  
55 ist ein schematisches Diagramm hinsichtlich der Affinitätsreinigung von Telomerase, das die Bindungsschritte und Elutionsschritte durch Verdrängung zeigt.
- Fig. 27  
60 ist ein Photo eines Northern-Blots von Telomerase-Präparationen, die während des in Beispiel 1 beschriebenen Reinigungsprotokolls erhalten wurden. Spur 1 enthielt 1,5 fMol Telomerase-RNA, Spur 2 4,6 fMol, Spur 3 14 fMol, Spur 4 41 fMol, Spur 5 nucleären Extrakt (42 fMol Telomerase), Spur 6 Affi-G I-Heparin-gereinigt Telomerase (47 fMol Telomerase), Spur 7 affinitätsgeräumte Telomerase (68 fMol) und Spur 8 über Glyceringradienten gereinigte Telomerase (35 fMol).
- 65

- Fig. 28  
zeigt Telomerase-Aktivitäten während eines Reinigungsprotokolls.
- Fig. 29  
ist ein Photo eines SDS-PAGE-Gels, das die Anwesenheit eines Polypeptids mit etwa 123 kD und einer  
5 Dublette mit etwa 43 kD von *Euplotes aediculatus* zeigt.
- Fig. 30  
ist eine Graphik, die den Sedimentationskoeffizienten von *Euplotes aediculatus*-Telomerase zeigt.
- Fig. 31  
ist ein Photo eines Polyacrylamid/Harnstoff-Gels mit 36% Formamid, das die Substratverwertung von  
10 *Euplotes*-Telomerase zeigt.
- Fig. 32  
zeigt die vermuteten Ausrichtungen von Telomerase-RNA-Matrize und Haarnadelstruktur-Primern mit  
Telomerase-RNA.
- Fig. 33  
ist ein Photo der Spuren 25 bis 30 des in Fig. 31 gezeigten Gels mit geringerer Belichtung.
- Fig. 34  
zeigt die DNA-Sequenz des Gens, das die 43 kD-Telomerase-Proteinuntereinheit von *Euplotes* codiert.
- Fig. 35  
(vier Seiten) zeigt die DNA-Sequenz sowie die Aminosäuresequenzen aller drei offenen Leserahmen  
20 der 43 kD Telomerase-Proteinuntereinheit von *Euplotes*.
- Fig. 36  
zeigt einen Sequenzvergleich zwischen der 123 kD-Telomerase-Proteinuntereinheit von *Euplotes* (obere  
Sequenz) und der 80 kD-Polypeptid-Untereinheit von *T. thermophila* (untere Sequenz).
- Fig. 37  
25 zeigt einen Sequenzvergleich zwischen der 123 kD-Telomerase-Proteinuntereinheit von *E. aediculatus*  
(obere Sequenz) und dem 95 kD-Telomerase-Polypeptid von *T. thermophila* (untere Sequenz).
- Fig. 38  
zeigt die «best-fit»-Ausrichtung zwischen einem Teil der «La-Domäne» der 43 kD-Telomerase-Protein-  
untereinheit von *E. aediculatus* (obere Sequenz) und einem Teil der 95 kD-Polypeptiduntereinheit von  
30 *T. thermophila* (untere Sequenz).
- Fig. 39  
zeigt die «best-fit»-Ausrichtung zwischen einem Teil der «La-Domäne» der 43 kD-Telomerase-Protein-  
untereinheit von *E. aediculatus* (obere Sequenz) und einem Teil der 80 kD-Polypeptid-Untereinheit von  
35 *T. thermophila* (untere Sequenz).
- Fig. 40  
zeigt die Ausrichtung und die Motive der Polymerase-Domäne der 123 kD-Telomerase-Proteinunterein-  
heit von *E. aediculatus* und der Polymerase-Domänen von verschiedenen reversen Transkriptasen,  
wozu auch ein Cytochrom-Oxidase-Gruppe II Intron 1-codiertes Protein von *S. cerevisiae*-Mitochondrien  
(al S.c. (Gruppe II)) zählen, Dong (LINE) und Hefe ESTp (L8543.12).
- Fig. 41  
40 zeigt die Ausrichtung einer Domäne der 43 kD Telomerase-Proteinuntereinheit mit verschiedenen La-  
Proteinen.
- Fig. 42  
zeigt die Nucleotidsequenz, die *T. thermophila* 80 kD-Protein-Untereinheit codiert.
- Fig. 43  
45 zeigt die Aminosäuresequenz der *T. thermophila* 80 kD-Protein-Untereinheit.
- Fig. 44  
zeigt die Nucleotidsequenz, die die *T. thermophila* 95 kD-Protein-Untereinheit codiert.
- Fig. 45  
50 zeigt die Aminosäuresequenz der *T. thermophila* 95 kD Protein-Untereinheit.
- Fig. 46  
zeigt die Aminosäuresequenz von L8543.12 («Est2p»).
- Fig. 47  
zeigt die Ausrichtung der durch das *Oxytricha* PCR-Produkt codierten Aminosäuresequenz mit der *Eu-  
55 plotes* p123-Sequenz.
- Fig. 48  
zeigt die DNA-Sequenz von Est2.
- Fig. 49  
zeigt die partielle Aminosäuresequenz eines cDNA-Clons, der Peptidmotive menschlicher Telomerase  
60 codiert.
- Fig. 50  
zeigt die partielle DNA-Sequenz eines cDNA-Clons, der Peptidmotive menschlicher Telomerase codiert.

- Fig. 51  
zeigt die Aminosäuresequenz von tez1, das auch als *S. pombe* trt bezeichnet wird.
- Fig. 52  
(zwei Seiten) zeigt die DNA-Sequenz von tez1. Intron-Bereiche und andere nicht codierende Bereiche sind in Kleinbuchstaben gezeigt und Exons (d.h. codierende Bereich) sind mit Grossbuchstaben angegeben.
- Fig. 53  
zeigt die Ausrichtung von EST2p, Euplotes und Tetrahymena-Sequenzen, sowie «Consensus»-Sequenzen.
- Fig. 54  
zeigt die Sequenzen von Peptiden, die für die Herstellung von anti-hTRT-Antikörpern nützlich sind.
- Fig. 55  
ist eine schematische Zusammenfassung der tez1\*-Sequenzierungsexperimente.
- Fig. 56  
zeigt zwei degenerierte Primer, die in der PCR zur Identifizierung des *S. pombe*-Homologen zu den *E. aediculatus* p123-Sequenzen verwendet wurden.
- Fig. 57  
zeigt die vier Hauptbanden, die in der PCR mit den degenerierten Primern zur Identifizierung des *S. pombe*-Homologen, zu den *E. aediculatus* p123-Sequenzen verwendet wurden.
- Fig. 58  
zeigt die Ausrichtung des M2-PCR-Produkts mit *E. aediculatus* p123, *S. cerevisiae* und *Oxytricha*-Telomerase-Proteinsequenzen.
- Fig. 59  
ist ein Schema, das die 3'-RT-PCR-Strategie für die Identifizierung des *S. pombe*-Homologen zu dem *E. aediculatus* p123 zeigt.
- Fig. 60  
zeigt Merkmale der Banken, die verwendet wurden, um nach *S. pombe* Telomerase-Proteinsequenz zu screenen und die Ergebnisse des Screenings.
- Fig. 61  
zeigt die positiven Ergebnisse, die mit den HindIII-gespaltenen positiven genomischen Clonen erhalten wurden, die die *S. pombe*-Telomerase-Sequenz enthalten.
- Fig. 62  
ist ein Schema, das die 5'-RT-PCR-Strategie zeigt, die zum Erhalt des *S. pombe* TRT-Clons mit vollständiger Länge verwendet wurde.
- Fig. 63  
zeigt die Ausrichtung von RT-Domänen von katalytischen Untereinheiten von Telomerase für *S. pombe* (*S.p.*), *S. cerevisiae* (*S.c.*) und *E. aediculatus* (*E.a.*).
- Fig. 64  
zeigt die Ausrichtung von Sequenzen von Euplotes («Ea\_P123»), *S. cerevisiae* («Sc\_Est2P») und *S. pombe* («Sp\_Tez1p»). In Teil A kennzeichnen die schattierten Bereiche Reste, die beide Sequenzen gemeinsam haben. In Teil B bezeichnen die schattierten Bereiche Reste, die alle drei Sequenzen gemeinsam haben.
- Fig. 65  
zeigt die für die Telomerase-Gene in *S. pombe* verwendete Disruptionsstrategie.
- Fig. 66  
zeigt die experimentellen Ergebnisse, die die Disruption von tez1 bestätigen.
- Fig. 67  
zeigt die progressive Verkürzung von Telomeren in *S. pombe* aufgrund der Disruption von tez1.
- Fig. 68  
(vier Seiten) zeigt die DNA-Sequenz und Aminosäuresequenz des ORF, der ein Telomerase-Protein von etwa 63 kD codiert oder ein Fragment davon, codiert von der EcoRI-NotI-Insertion des Genbank-Clons #AA281296.
- Fig. 69  
zeigt eine Ausrichtung von reverser Transkriptase-Motiven aus verschiedenen Quellen.
- Fig. 70  
ist eine Restriktionskarte und funktionelle Karte von Plasmid pGRN121.
- Fig. 71  
(zwei Seiten) zeigt die Ergebnisse von vorläufigen Analysen der Nucleinsäure-Sequenzierung einer hTRTcDNA-Sequenz.
- Fig. 72  
(10 Seiten) zeigt die vorläufige Nucleinsäure von hTRT und die abgeleiteten ORF-Sequenzen in den drei Leserahmen.
- Fig. 73  
ist eine Restriktionskarte und funktionelle Karte von Plasmid pGRN121.

- Fig. 74  
(8 Seiten) zeigt die verbesserte Nucleinsäuresequenz und abgeleitete ORF-Sequenzen von hTRT.  
Fig. 75  
zeigt eine Restriktionskarte des lambda-Clons 25-1.1.  
5 Fig. 76  
zeigt eine Karte der Restriktions-Stellen und Bereiche von DNA pGRN144.4.

## I. Einleitung

- 10 Telomerase ist ein Ribonucleoproteinkomplex (RNP), der einen RNA-Bestandteil und einen katalytischen Protein-Bestandteil umfasst. Die vorliegende Erfindung betrifft die Clonierung und Charakterisierung des katalytischen Proteinbestandteils der Telomerase, der nachstehend «TRT» (Telomerase-reverse-Transkriptase) bezeichnet wird. Dieses Protein wird deshalb als TRT bezeichnet, weil es als eine RNA-abhängige DNA-Polymerase arbeitet, wobei der RNA-Bestandteil der Telomerase (nachstehend mit «TR» bezeichnet) zur Steuerung der Synthese der Telomer-DNA-Wiederholungssequenzen verwendet wird. Darüber hinaus ist TRT mit anderen reversen Transkriptasen evolutionär verwandt (siehe Beispiel 12).

- Ein Aspekt der vorliegenden Erfindung betrifft die Clonierung und Charakterisierung des katalytischen Proteinbestandteils der menschlichen Telomerase, die nachstehend als «hTRT» bezeichnet wird. 20 Menschliche TRT ist deshalb von ausserordentlichem Interesse und Wert, da, wie nachstehend angedeutet, Telomerase-Aktivität in Menschen (und weiteren Säuger-Zellen) mit der Eigenschaft der Zellproliferation, Zellimmortalität und der Entwicklung eines neoplastischen Phänotyps korreliert. Beispielsweise ist in unsterblichen menschlichen Zellen (z.B. maligne Tumorzellen und unsterbliche Zelllinien) die Telomerase-Aktivität und, wie in Beispiel 2 nachstehend gezeigt, die Menge an Genprodukten menschlicher TRT gegenüber sterblichen Zellen (z.B. den meisten menschlichen somatischen Zellen) erhöht.

- Die vorliegende Erfindung stellt ferner Verfahren und Zusammensetzungen bereit, die zur Diagnose, Prognose und zur Behandlung von menschlichen Erkrankungen und Krankheitszuständen von Wert ist, wie dies nachstehend ausführlich beschrieben wird. Ausserdem werden Verfahren und Reagenzien zur Verfügung gestellt, die zur Immortalisierung von Zellen (in vivo und ex vivo) von Nutzen sind, wobei 30 transgene Tiere mit erwünschten Merkmalen hergestellt werden, sowie zahlreiche weitere Verwendungsmöglichkeiten, die zum grossen Teil nachstehend beschrieben werden. Die Erfindung stellt auch Verfahren und Agenzien bereit, die für die Herstellung, die Clonierung und Re-Clonierung von TRT-Genen und -Proteinen aus Ciliaten, Pilzen, Vertebraten, beispielsweise Säugern, und anderen Organismen von Nutzen sind.

- 35 Wie nachstehend ausführlich beschrieben wird, wurde TRT zuerst nach Reinigung von Telomerase aus dem Ciliaten *Euplotes aediculatus* charakterisiert. Die umfassende Reinigung von *E. aediculatus* Telomerase unter Verwendung von RNA-Affinitätschromatographie und weiterer Verfahren lieferte das Protein «p123». Überraschenderweise stellte sich heraus, dass p123 mit Proteinen, von denen bisher angenommen wurde, dass sie Proteinuntereinheiten des Telomerase-Holoenzym darstellen (d.h. die p80- und p95-Proteine von *Tetrahymena thermophila*) nicht verwandt ist. Die Analyse der Sequenzen der p123-DNA und des Proteins (Genbank-Zugangsnummer U95964; Fig. 13 und 14) ergab das Vorhandensein von Motiven von reverser Transkriptase (RT), was mit der Rolle von p123 als katalytische Untereinheit der Telomerase konsistent ist (siehe z.B. Fig. 11). Darüber hinaus ist p123 mit dem Est1p-Protein aus *S. cerevisiae* (Hefe) verwandt, von dem bekannt war, dass es eine Rolle bei der Aufrechterhaltung der Telomere in *S. cerevisiae* spielt (Genbank-Zugangsnummer S5396). Es wurde jedoch vor 45 der vorliegenden Erfindung nicht erkannt, dass dieses ein Protein einer katalytischen Untereinheit von Telomerase codiert (siehe beispielsweise Lendvay et al., *Genetics* 144 (1996), 1399).

- Ein Aspekt der vorliegenden Erfindung betrifft Reagenzien und Verfahren zur Identifizierung und Clonierung neuer TRTs unter Verwendung von: Nucleinsäuresonden und Primern, die von den offenbarten TRT-Polynucleotiden erzeugt oder abgeleitet sind (z.B. zur Clonierung von TRT-Genen und cDNAs); 50 Antikörpern, die Motive, Motivsequenzen oder andere TRT-Epitope spezifisch erkennen (z.B. zur Expressionsclonierung von TRT-Genen oder zur Reinigung von TRT-Proteinen); das Screening von Computer-Datenbanken oder weiterer Hilfsmittel. Beispielsweise wurde die in Beispiel 1 beschriebene PCR-Amplifikation (Polymerase-Kettenreaktion) von DNA von *S. pombe* mit Primern mit degenerierten Sequenzen, die anhand der *Euplotes* p123 RT Motive B' und C entworfen wurden, ausgewählt. Von den vier erzeugten Hauptprodukten codierte eines eine Peptidsequenz, die homolog ist zur *Euplotes* p123 und *S. cerevisiae* Est2p. Die vollständige Sequenz des zur *S. pombe* TRT homologen Proteins wurde unter Verwendung dieses PCR-Produkts als Sonde durch Screenen von cDNA- und genomischen Banken von *S. pombe* und Amplifikation von *S. pombe* RNA durch reverse Transkription und PCR (RT-PCR) erhalten. Die vollständige Sequenz des *S. pombe* Gens (trt1"; Genbank-Zugangsnummer AF015783; Fig. 15) ergab, dass die Homologie zwischen p123 und Est2p in den Motiven für reverse 55 Transkriptase besonders hoch war.

- Die Amplifikation unter Verwendung von degenerierten Primern, die von den Telomerase RT-Motiven abgeleitet waren, wurde auch zum Erhalt von TRT-Gensequenzen aus *Oxytricha trifallax* und *Tetrahymena thermophila*, wie in Beispiel 1 beschrieben, verwendet. 65

Die erfindungsgemässen Sequenzen Euplotes p123, *S. pombe* trt1 und *S. cerevisiae* Est2p wurden bei der Suche in computerisierten Datenbanken von menschlichen exprimierten Sequenzen «tags» (ESTs) unter Verwendung des Programms «BLAST» (Altschul et al., J. Mol. Biol. 215 (1990), 403) verwendet. Die Suche in dieser Datenbank mit der Est2p-Sequenz ergab keine Übereinstimmung, ein menschliches EST (Genbank-Zugangsnummer AA281296; siehe SEQ. ID. Nr. 8) konnte jedoch wie in Beispiel 1 beschrieben durch Suche mit p123- und trt1-Sequenzen identifiziert werden. Dieses menschliche EST codiert vermutlich ein homologes Protein. Die vollständige Sequenzierung des cDNA-Clons, der das EST enthält (nachstehend als «Clon 712562» bezeichnet; siehe SEQ. ID. Nr. 3) zeigte das Vorhandensein von sieben RT-Motiven. Dieser Clon konnte jedoch ein zusammenhängendes menschliches TRT nicht codieren, da die Motive B', C, D und E im Vergleich zu den mehr NH<sub>2</sub>-terminal gelegenen Motiven in einem unterschiedlichen offenen Leserahmen (ORF) enthalten waren. Darüber hinaus war der Abstand zwischen den Motiven A und B' wesentlich geringer als bei den bereits charakterisierten TRTs. (Clon 712562 wurde von dem I.M.A.G.E.-Consortium erhalten; Lennon et al., Genomics 33 (1996), 151).

Der cDNA-Clon pGRN121, der ein funktionales hTRT codiert (SEQ. ID. Nr. 1) wurde aus einer cDNA-Bank isoliert, die von der humanen Zelllinie 293 stammte (siehe Beispiel 1). Der Vergleich des Clons 712562 mit pGRN121 ergab, dass Clon 712562 zwischen den Motiven A und B' eine Deletion von 182 Basenpaaren (SEQ. ID. Nr. 9) aufweist. Die in pGRN121 zusätzlich vorhandenen 182 Basenpaare führen dazu, dass alle TRT-Motive in einem einzigen offenen Leserahmen vorhanden sind, und dass sich der Abstand zwischen den Bereichen des Motivs A und des Motivs B' so vergrössert, dass dies konsistent ist mit dem Abstand bei anderen bekannten TRTs. Wie nachstehend in den Beispielen beschrieben (z.B. Beispiel 7) codiert SEQ. ID. Nr. 1 ein katalytisch aktives Telomerase-Protein mit der Sequenz von SEQ. ID. Nr. 2. Das Polypeptid von SEQ. ID. Nr. 2 weist 1132 Aminosäuren und ein geschätztes Molekulargewicht von etwa 127 Kilodaltons (kD) auf.

Wie nachstehend diskutiert und in Beispiel 9 beschrieben, werden die für den Clon 712562 charakteristische Deletion von 182 Basenpaaren aufweisende TRT-cDNAs im Anschluss an die reverse Transkription von mRNA aus Telomerase-positiven Zellen (z.B. Testes- und 293-Zellen) nachgewiesen. hTRT-RNAs, denen diese Sequenz von 182 Basenpaaren fehlt, werden allgemein als «Δ182-Varianten» bezeichnet und diese können eine, zwei oder mehrere Spezies repräsentieren. Die hTRT-Varianten, denen die in der pGRN121-cDNA (SEQ. ID. Nr. 1) gefundene Sequenz von 182 Basenpaaren fehlt, codieren zwar höchstwahrscheinlich kein Telomerase-Enzym mit vollständiger katalytischer Aktivität, sie können jedoch eine Rolle bei der Telomerase-Regulation, wie nachstehend beschrieben, spielen und/oder partielle Telomerase-Aktivität aufweisen, beispielsweise eine Aktivität für die Telomer-Bindung oder hTR-Bindung, wie nachstehend diskutiert.

Ein Aspekt der vorliegenden Erfindung besteht somit in der Bereitstellung eines isolierten Polynucleotids mit einer Sequenz eines natürlich vorkommenden menschlichen TRT-Gens oder einer mRNA, wobei ein Polynucleotid mit der Sequenz von SEQ. ID. Nr. 1 eingeschlossen ist, allerdings ohne jedoch darauf beschränkt zu sein. Ein verwandter Aspekt der vorliegenden Erfindung betrifft die Bereitstellung eines Polynucleotids, das ein hTRT-Protein codiert, ein Fragment, eine Variante oder ein Derivat. Ein weiterer verwandter Aspekt der vorliegenden Erfindung betrifft die Bereitstellung von «sense»- und «antisense»-Nucleinsäuren, die an ein hTRT-Gen oder mRNA binden. Die vorliegende Erfindung stellt ferner hTRT-Proteine bereit, die entweder synthetisiert oder von natürlichen Quellen gereinigt wurden, sowie Antikörper und weitere Agenzien, die spezifisch ein hTRT-Protein oder ein Fragment davon binden. Die vorliegende Erfindung stellt auch viele neue Verfahren bereit, zu denen Verfahren gehören, die die vorstehend erwähnten Zusammensetzungen verwenden, beispielsweise durch Bereitstellung von diagnostischen und prognostischen Assays bezüglich menschlicher Erkrankungen, Verfahren zur Entwicklung von Arzneimitteln und therapeutischen Verfahren, zur Identifizierung von Telomerase-assoziierten Proteinen und Verfahren zum Screenen nach Agenzien, die Telomerase-Aktivität aktivieren oder hemmen können. Zahlreiche weitere Aspekte und Ausführungsformen der vorliegenden Erfindung werden nachstehend bereitgestellt.

Ein Aspekt der Erfindung ist die Verwendung eines Polynucleotids, das eine Länge von etwa 10 kb oder mehr aufweist, und eine aufeinanderfolgende Sequenz von mindestens 10 Nucleotiden umfasst, die zu einer aufeinanderfolgenden Sequenz in einem natürlich vorkommenden hTRT-Gen oder einer hTRT-mRNA identisch oder genau komplementär ist zum Untersuchen oder dem Screenen (nach) einer hTRT-Gensequenz oder einer hTRT-mRNA oder zur Herstellung einer rekombinanten Wirtszelle. Ein weiterer Aspekt der Erfindung ist die Verwendung eines Agens, das die Expression von hTRT erhöht, zur Herstellung eines Arzneimittels zur Behandlung eines Zustands, der durch die Erhöhung der Proliferationskapazität einer Vertebratenzelle behandelt wird, wobei gegebenenfalls das Arzneimittel zur Hemmung der Auswirkungen des Alterns verwendet wird.

Ein weiterer Aspekt der Erfindung betrifft die Verwendung eines Inhibitors von Telomerase-Aktivität bei der Herstellung eines Medikaments zur Behandlung eines Zustands, der mit einem erhöhten Spiegel an Telomerase-Aktivität innerhalb einer menschlichen Zelle assoziiert ist. Die erfindungsgemässen Proteine, Varianten und Fragmente und die codierenden Polynucleotide oder Fragmente, werden auch in einem weiteren Aspekt dieser Erfindung zur Verwendung als Arzneimittel bereitgestellt.

Die Erfindung betrifft ferner die Verwendung eines Proteins, einer Variante oder eines Fragments davon oder eines Polynucleotids oder Fragments, wie hier definiert, bei der Herstellung eines Medika-

ments, beispielsweise bei der Herstellung eines Medikaments zur Hemmung eines Effekts des Alterns oder von Krebs.

In bestimmten erfindungsgemässen Ausführungsformen sind die hTRT-Polynucleotide nicht das Polynucleotid mit 389 Nucleotiden von SEQ. ID. Nr. 8 und/oder nicht Clon 712562, das Plasmid, das eine Insertion enthält mit der Sequenz von SEQ. ID. Nr. 3 in Fig. 18.

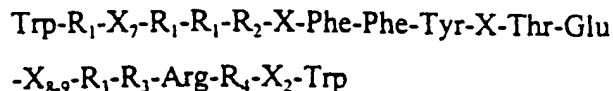
Die nachstehende Beschreibung ist nach Themen aufgebaut. Teil II beschreibt weitere für TRT-Proteine charakteristische Aminosäuremotive. Die Teile III bis VI beschreiben unter anderem Nucleinsäuren, Proteine, Antikörper und gereinigte Zusammensetzungen der Erfindung, wobei der Schwerpunkt auf mit menschlicher TRT verwandten Zusammensetzungen liegt. Teil VII beschreibt unter anderem Verfahren und Zusammensetzungen der Erfindung, die zur Behandlung von menschlichen Erkrankungen von Nutzen sind. Teil VIII beschreibt die Herstellung und Identifizierung von immortalisierten menschlichen Zelllinien. Teil IX beschreibt unter anderem die Verwendung der erfindungsgemässen Nucleinsäuren, Polynucleotide und weiterer Zusammensetzungen zur Diagnose von menschlichen Erkrankungen. Teil X ist ein Glossar der in den Teilen I bis IX verwendeten Bezeichnungen. Teil XI beschreibt Beispiele, die sich auf spezifische erfindungsgemässe Ausführungsformen beziehen. Die Beschreibung der Erfindung ist nach Themen und Unterthemen gegliedert, um den Stoff verständlicher zu machen, stellt jedoch in keiner Weise eine Einschränkung dar.

## II. TRT-Gene und Proteine

Die vorliegende Erfindung stellt isolierte und/oder rekombinante Gene und Proteine bereit, die eine Sequenz einer katalytischen Untereinheit des Telomerase-Proteins (d.h. Telomerase-reverse-Transkriptase) aufweisen, wozu, allerdings ohne Beschränkung darauf, die natürlich vorkommenden Formen solcher Gene und Proteine in isolierter oder rekombinanter Form gehören. Typischerweise sind TRTs grosse, basische Proteine mit für reverse Transkriptase (RT) und Telomerase-spezifischen Aminosäuremotiven, so wie dies hier offenbart ist. Da diese Motive innerhalb unterschiedlicher Organismen konserviert sind, können TRT-Gene zahlreiche Organismen unter Verwendung der erfindungsgemässen Verfahren oder unter Verwendung erfindungsgemässer Primer, Nucleinsäuresonden und Antikörpern, beispielsweise solcher, die für ein oder mehrere der Motivsequenzen spezifisch sind, erhalten werden.

Die sieben in TRTs gefundenen RT-Motive ähneln zwar den in anderen reversen Transkriptasen gefundenen, weisen jedoch besondere Kennzeichen auf. Beispielsweise gibt es innerhalb der TRT-RT-Motive wie in Fig. 4 gezeigt, eine Reihe von Aminosäuresubstitutionen (mit Pfeil markiert) in Aminosäureresten, die innerhalb der anderen RTs hoch konserviert sind. Beispielsweise kommen die zwei Asparaginsäurereste (DD) im Motiv C, die die Metallionen im aktiven Zentrum koordinieren (siehe Kohlstaedt et al., Science 256 (1992), 1783; Jacobo-Molina et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90 (1993), 6320; Patel et al., Biochemistry 34 (1995), 5351) in dem Kontext hxDD(F/Y) in den RTs von Telomerase vor, während diese in den anderen RTs im Kontext (F/Y)xDDh vorkommen, wobei h eine hydrophobe Aminosäure ist und «x» eine beliebige Aminosäure ist; siehe Xiong et al., EMBO J. 9 (1990) 3353; Eickbush, in The Evolutionary Biology of Viruses (S. Morse Herausg. Raven-Press, NY, S. 121 (1994)). Weitere für die Telomerase-Untergruppen charakteristische systematische Austausche kommen in dem Motiv E vor, in dem WxGxSx eine «Consensus»-Sequenz darstellt oder innerhalb der Telomerase-Proteine konserviert ist, während hLGxxh für andere RTs charakteristisch ist (Xiong et al., a.a.O.; Eickbush, a.a.O.). Dieses Motiv E wird als der «Primer-Griff» (primer-grip) bezeichnet und es wurde beschrieben, dass Mutationen in diesem Bereich das «RNA-Priming» beeinflussen, jedoch nicht das «DNA-Priming» (Powell et al., J. Biol. Chem. 272 (1997), 13262). Da Telomerasen einen DNA-Primer, (z.B. das 3'-Ende des Chromosoms) benötigen, ist es nicht überraschend, dass sich Telomerase von anderen RTs im Bereich des «Primer-Griffs» unterscheidet. Darüber hinaus ist die Entfernung zwischen den Motiven A und B' in den TRTs grösser wie dies typischerweise in den anderen RTs der Fall ist, wobei dies eine Insertion innerhalb des «Finger»-Bereichs der Struktur, die einer rechten Hand ähnelt, darstellen kann (Fig. 3; siehe Kohlstaedt et al., a.a.O.; Jacobo-Molina et al., a.a.O.; und Patel et al., a.a.O.).

Weiterhin ist das T-Motiv, wie vorstehend erwähnt, ein zusätzliches Kennzeichen von TRT-Proteinen. Das beispielsweise in der Fig. 4 gezeigte T-Motiv (W-L-X-Y-X-X-h-X-h-X-p-F-F-Y-X-T-E-X-p-X-X-X-p-X-X-X-Y-X-R-K-X-X-W, wobei X eine beliebige Aminosäure ist, h hydrophob und p polar ist) umfasst eine Sequenz, die unter Verwendung der folgenden Formel beschrieben werden kann:



wobei X eine beliebige Aminosäure ist und die tiefgestellte Zahl sich auf eine Zahl von aufeinanderfolgenden Resten bezieht, R<sub>1</sub> Leucin oder Isoleucin ist, R<sub>2</sub> Glutamin oder Arginin, R<sub>3</sub> Phenylalanin oder Tyrosin und R<sub>4</sub> Lysin oder Histidin ist.

Das T-Motiv kann auch unter Verwendung der folgenden Formel beschrieben werden:



Trp-R<sub>1</sub>-X<sub>4</sub>-h-h-X-h-h-R<sub>2</sub>-p-Phe-Phe-Tyr-X-Thr-Glu-

X-p-X<sub>3</sub>-p-X<sub>2,3</sub>-R<sub>3</sub>-R<sub>3</sub>-Arg-R<sub>4</sub>-X<sub>2</sub>-Trp

5 wobei X eine beliebige Aminosäure ist und sich eine tiefgestellte Zahl auf eine Anzahl von aufeinanderfolgenden Resten bezieht, R<sub>1</sub> Leucin oder Isoleucin ist, R<sub>2</sub> Glutamin oder Arginin, R<sub>3</sub> Phenylalanin oder Tyrosin, R<sub>4</sub> Lysin oder Histidin, h eine hydrophobe Aminosäure ausgewählt als Ala, Leu, Ile, Val, Pro, Phe, Trp, und Met und p eine polare Aminosäure ausgewählt als Gly, Ser, Thr, Tyr, Cys, Asn und Gln ist.

10 In einer weiteren Ausführungsform stellt die vorliegende Erfindung isolierte, natürlich vorkommende und rekombinante TRT-Proteine bereit, die eines oder mehrere der in Fig. 11 dargestellten Motive umfassen, beispielsweise,

15	Motif T	W-X <sub>12</sub> -FFY-X-TE-X <sub>10,11</sub> -R-X <sub>3</sub> -W-X <sub>7</sub> -I
	Motif T'	E-X <sub>3</sub> -V-X
	Motif 1	X <sub>3</sub> -R-X <sub>2</sub> -PK-X <sub>3</sub>
20	Motif 2	X-R-X-I-X
	Motif A	X <sub>4</sub> -F-X <sub>3</sub> -D-X <sub>4</sub> -YD-X <sub>2</sub>
25	Motif B'	Y-X <sub>4</sub> -G-X <sub>2</sub> -QG-X <sub>3</sub> -S-X <sub>8</sub>
	Motif C	X <sub>6</sub> -DD-X-L-X <sub>3</sub>

30 Wenn das gezeigte TRT-Protein mehr als ein TRT-Motiv enthält, ist die Reihenfolge (NH<sub>2</sub>→COOH) wie in Fig. 4 gezeigt.

In einer weiteren Ausführungsform stellt die vorliegende Erfindung isolierte, natürlich vorkommende TRT-Proteine bereit, die folgendes Supermotiv umfassen:

35 (NH<sub>2</sub>)-X<sub>300-600</sub>-W-X<sub>12</sub>-FFY-X-TE-X<sub>10,11</sub>-R-X<sub>3</sub>-W-X<sub>7</sub>-I-X<sub>5,20</sub>-E-X<sub>2</sub>-V-X-X<sub>5,20</sub>-X<sub>3</sub>-R-X<sub>2</sub>-PK-X<sub>4,10</sub>-R-X-I-X-X<sub>60,80</sub>-X<sub>4</sub>-F-X<sub>3</sub>-D-X<sub>4</sub>-YD-X<sub>2</sub>-X<sub>80,130</sub>-Y-X<sub>4</sub>-G-X<sub>2</sub>-QG-X<sub>3</sub>-S-X<sub>8</sub>-X<sub>5,35</sub>-X<sub>6</sub>-DD-X-L-X<sub>3</sub>-X<sub>10,20</sub>-X<sub>12</sub>-K

40 Es ist für den Fachmann, der über die hier offenbarten Reagenzien, einschliesslich der TRT-Sequenzen verfügt, offensichtlich, dass mit diesen Reagenzien und den hier bereitgestellten Verfahren und Lehren (einschliesslich spezifischer nachstehend beschriebenen Verfahrensweisen) TRT-Gene und -Proteine vom Fachmann erhalten, isoliert und in rekombinanter Form hergestellt werden können. Beispielsweise werden Primer (z.B. degenerierte Amplifikationsprimer) bereitgestellt, die mit Gensequenzen hybridisieren, die für TRT charakteristische RT- und T-Motive codieren. Beispielsweise können einer oder mehrere Primer oder degenerierte Primer hergestellt werden, die mit Sequenzen hybridisieren, die den FFYXTE-Bereich des T-Motivs, weitere TRT-Motive (wie nachstehend diskutiert) oder Kombinationen von Motiven oder «Consensus»-Sequenzen codieren, basierend auf der Codon-Verwendung des Zielorganismus, und zur Amplifikation der TRT-Gensequenz aus genomischer DNA oder cDNA, die von dem Zielorganismus hergestellt wurde, verwendet werden. Die Verwendung von degenerierten Primern ist auf dem Fachgebiet gut bekannt. Dazu gehören auch Primersätze, die mit dem Satz von Nucleinsäuresequenzen hybridisieren, die möglicherweise die Aminosäuren des Zielmotivs codieren. Dabei muss die Bevorzugung und Verwendung bestimmter Codons innerhalb des Zielorganismus in Erwägung gezogen werden. Dabei werden auch Amplifikations- (z.B. PCR)-Bedingungen angewandt, die geeignet sind, Fehlpaarungen von Basen bei den Anlagerungsschritten der PCR zu erlauben. Typischerweise werden zwei Primer verwendet, Amplifikationssysteme mit einem einzigen Primer (oder in diesem Fall ein Satz mit einem einzelnen degenerierten Primer) sind allgemein bekannt, und diese können auch zum Erhalt von TRT-Genen verwendet werden.

60 Tabelle 1 zeigt Beispiele von erfindungsgemässen Primern, die zur Amplifikation neuer TRT-Nucleinsäuren, insbesondere solchen aus Vertebraten (z.B. Säuger), verwendet werden können. «N» ist ein äquimolares Gemisch aller vier Nucleotide und Sequenz n in Klammern stellen äquimolare Gemische der angegebenen Nucleotide dar.

65

Tabelle 1

5 BEISPIELE DEGENERIERTER PRIMER ZUR AMPLIFIKATION VON TRT-  
NUCLEINSÄUREN

10

15	<u>Motiv</u>	<u>Richtung</u>	<u>5'-Sequenz-3'</u>
	a <u>FFYVIE</u>	Vorwärts	TT(CT)TT(CT)TA(CT)GTNACNGA
20	b <u>FFYVIE</u>	Rückwärts	TCNGTNAC(GA)TA(GA)AA(GA)AA
	c <u>RFIPKP</u>	Vorwärts	(CA)GNTT(CT)AT(ACT)CCNAA(AG)CC
25	d <u>RFIPKP</u>	Rückwärts	GG(TC)TTNGG(TGA)AT(GA)AANC
	e <u>AYDTI</u>	Vorwärts	GCNTA(CT)GA(CT)ACNAT
30	f <u>AYDTI</u>	Rückwärts	TANGT(GA)TC(GA)TANGC
	g <u>GIPOG</u>	Vorwärts	GGNAT(ACT)CCNCA(AG)GG
35	h <u>GIPOGS</u>	Rückwärts	(GC)(AT)NCC(TC)TGNGG(TGA)ATNCC
	i <u>LVDDFL</u>	Vorwärts	(CT)INGTNGA(CT)GA(CT)TT(CT)(CT)T
40	j <u>DDFLLVT</u>	Rückwärts	GTNACNA(GA)NA(GA)(GA)AA(GA)TC(GA)TC

45 Erlaubte Primer-Kombinationen (y = ja, n = nein)

		<u>Rückwärts</u>				
	<u>Vorwärts</u>	b	d	f	h	i
50	a -	n	y	y	y	y
	c -	n	n	y	y	y
	e -	n	n	n	y	y
55	g -	n	n	n	n	y
	i -	n	n	n	n	n

60 In einer Ausführungsform wird eine amplifizierte TRT-Nucleinsäure als Hybridisierungssonde zur Kolonie-Hybridisierung mit einer Genbank (z.B. einer cDNA-Bank), die aus dem Zielorganismus hergestellt wurde, verwendet, wobei eine Nucleinsäure mit der das gesamte TRT-Protein oder einen wesentlichen Anteil davon codierende Sequenz identifiziert und isoliert oder cloniert wird. Ragenzien und Verfahren, wie beispielsweise die gerade beschriebenen, werden in Übereinstimmung mit den hier beschriebenen Verfahren zum Erhalt von TRT-Gensequenzen aus *Oxytricha trifallax* und *Tetrahymena thermophila*, wie

65

nachstehend ausführlich beschrieben, verwendet. Natürlich kann im Anschluss an die Clonierung eines bisher nicht charakterisierten TRT-Gens die Sequenz durch Routineverfahren bestimmt und das codierte Polypeptid synthetisiert und auf eine TRT-Aktivität, beispielsweise der katalytischen Aktivität von Telomerase, untersucht werden (wie hier beschrieben und/oder mittels auf dem Fachgebiet bekannter Telomerase-Assays).

Es ist für den Fachmann auch offensichtlich, dass TRT-Gene unter Verwendung einer Vielzahl von erfindungsgemässen Clonierungsverfahren cloniert werden können, da die TRT-Motivsequenzen und die solche Sequenzen umfassenden erfindungsgemässen Nucleinsäuren in einer grossen Anzahl solcher Verfahren verwendet werden können. Beispielsweise kann Hybridisierung unter Verwendung einer Sonde, die auf der Sequenz einer bekannten TRT basiert mit DNA- oder weiteren Nucleinsäure-Banken aus dem Zielorganismus, wie in Beispiel 1 beschrieben, verwendet werden. Degenerierte PCR-Primer oder ihre Amplifikationsprodukte, beispielsweise die vorstehend beschriebenen, können selbst markiert sein und als Hybridisierungssonden verwendet werden. In einer weiteren Ausführungsform werden Expressionsclonierungs-Verfahren angewandt. Beispielsweise können einer oder mehrere Antikörper, die Peptide spezifisch binden, die ein TRT-Motiv oder ein anderes TRT-Epitop umspannen, beispielsweise das FFYXTE-Motiv (wobei X eine beliebige der 20 Standard-Aminosäuren darstellt) spezifisch binden, zur Isolation eines ribosomalen Komplexes verwendet werden, der ein TRT-Protein und die dieses codierende mRNA umfasst. Zur Herstellung der erfindungsgemässen Antikörper weisen die Peptid-Immungene typischerweise eine Länge von 6 bis 30 Aminosäuren auf, bevorzugt 10 bis 20 Aminosäuren. Die Antikörper können auch zum Absuchen einer cDNA-Expressionsbank, die von dem gewünschten Organismus stammt, zur Identifikation eines eine TRT-Sequenz codierenden Clons verwendet werden. In einer weiteren Ausführungsform können zur Identifikation eines eine TRT-Sequenz codierten Clons DNA-Datenbanken per Computer nach DNAs durchsucht werden, die innerhalb bekannter TRTs konservierte Sequenzen enthalten.

Ein weiterer Aspekt der vorliegenden Erfindung betrifft die Bereitstellung von Zusammensetzungen, die ein isoliertes oder rekombinantes Polypeptid mit der Sequenz eines natürlich vorkommenden TRT-Proteins umfassen. Üblicherweise hat die natürlich vorkommende TRT ein Molekulargewicht zwischen etwa 80 000 Daltons (d) und etwa 150 000 d, bevorzugt zwischen etwa 95 000 d und etwa 130 000 d. Typischerweise hat die natürlich vorkommende TRT bei einem pH-Wert von 7 eine positive Gesamtladung (wobei der geschätzte pI typischerweise über 9 liegt). In einer Ausführungsform weist das Polypeptid eine wie hier definierte Telomerase-Aktivität auf. In einer verwandten Ausführungsform weist das Polypeptid eine Sequenz für einen TRT-spezifischen Bereich (T-Motiv) auf und eine Telomerase-Aktivität. Die Erfindung stellt ferner Fragmente solcher Polypeptide bereit. Die vorliegende Erfindung stellt ausserdem isolierte oder rekombinante Polynucleotide mit der Sequenz eines natürlich vorkommenden, ein TRT-Protein codierenden Gens bereit. Die Erfindung stellt auch isolierte TRT-Polynucleotide mit einer Sequenz einer TRT eines Nicht-Vertebraten (z.B. von Hefe) und Vertebraten, beispielsweise Säugern (z.B. Mäusen oder Menschen) bereit. Die isolierten Polynucleotide können mit anderen natürlich vorkommenden oder Vektor-Nucleinsäuresequenzen assoziiert sein. Typischerweise liegt die Länge der isolierten Nucleinsäure unter etwa 300 kb, bevorzugt unter etwa 50 kb, mehr bevorzugt unter etwa 20 kb und am meisten bevorzugt unter etwa 10 kb. Gelegentlich liegt die Länge unter etwa 5 kb oder 2 kb. In einigen Ausführungsformen ist das isolierte TRT-Polynucleotid sogar noch kleiner, beispielsweise handelt es sich dabei um ein Genfragment, einen Primer oder eine Sonde mit einer Länge unter etwa 1 kb oder 0,1 kb.

### III. Nucleinsäuren

#### A) Allgemeines

Die vorliegende Erfindung stellt isolierte und rekombinante Nucleinsäuren bereit mit einer Sequenz eines Polynucleotids, das eine katalytische Untereinheit des Telomerase-Proteins (TRT) codiert, beispielsweise ein rekombinantes TRT-Gen aus *Euplotes*, *Tetrahymena*, *S. pombe* oder Menschen. Beispiele für Polynucleotide sind dargestellt in Fig. 13 (*Euplotes*), Fig. 15 (*S. pombe*) und Fig. 16 (Mensch, Genbank-Zugangsnummer AF15950). Die vorliegende Erfindung stellt «sense» und «anti-sense»-Polynucleotide mit einer TRT-Gensequenz bereit, dazu zählen auch Sonden, Primer, TRT-Protein-codierende Polynucleotide und ähnliches.

#### B) Menschliche TRT

Die vorliegende Erfindung stellt Nucleinsäuren bereit mit einer Sequenz einer katalytischen Untereinheit einer Telomerase aus Menschen (d.h. hTRT).

Ein Aspekt der Erfindung betrifft die Bereitstellung eines Polynucleotids mit einer Sequenz oder Untersequenz eines menschlichen TRT-Gens oder einer RNA. In einer Ausführungsform besitzt das erfindungsgemässe Polynucleotid eine Sequenz der SEQ. ID. Nr. 1 (Fig. 16) oder eine Untersequenz davon. In einer weiteren Ausführungsform weist das Polynucleotid eine Sequenz der SEQ. ID. Nr. 3 (Fig. 18), SEQ. ID. Nr. 4 (Fig. 20) oder Untersequenzen davon auf. Die Erfindung stellt auch Polynucleotide mit

im wesentlichen zu den hier offenbarten hTRT-Nucleinsäuresequenzen identischen Sequenzen bereit, beispielsweise SEQ. ID. Nr. 1 und die weiteren offenbarten Sequenzen (z.B. SEQ. ID. Nr. 4, 6 (Fig. 21) und 7 (Fig. 12)). Somit stellt die Erfindung natürlich vorkommende Allele der menschlichen TRT-Gene und Varianten der Polynucleotidsequenzen bereit mit einer oder mehrerer Nucleotiddeletionen, Insertionen oder Substitutionen, bezogen auf eine hier offenbarte hTRT-Nucleinsäuresequenz. Wie nachstehend beschrieben, können Varianten der Nucleinsäuren unter Verwendung der nachstehend beschriebenen Rekombinationsverfahren oder synthetischer Verfahren oder durch andere Mittel hergestellt werden.

Die Erfindung stellt auch isolierte und rekombinante Polynucleotide mit einer Sequenz eines flankierenden Bereichs eines menschlichen TRT-Gens bereit. Zu diesen Polynucleotiden zählen solche, die von genomischen Sequenzen von untranslatierten Bereichen der hTRT-mRNA abstammen. Ein Beispiel für eine genomische Sequenz ist SEQ. ID. Nr. 6 (Fig. 21). Wie in Beispiel 4 beschrieben, wurde SEQ. ID. Nr. 6 durch Sequenzierung des Clons  $\lambda$ G $\Phi$ 5, der aus einer menschlichen Genombank isoliert wurde, erhalten.  $\lambda$ G $\Phi$ 5 enthält eine Insertion mit einer Länge von 15 Kilobasenpaaren (kbp), die ungefähr 13 000 Basen 5' zu den hTRT codierenden Sequenzen einschliessen. Dieser Clon enthält hTRT-Promotorsequenzen und weitere regulatorische Sequenzen des hTRT-Gens (z.B. Enhancer).

Die Erfindung stellt auch isolierte und rekombinante Polynucleotide mit einer Sequenz aus einem Intronbereich eines menschlichen TRT-Gens bereit. Ein Beispiel für eine Intronsequenz ist SEQ. ID. Nr. 7 (siehe Beispiel 3 und Fig. 12). In einigen Ausführungsformen sind hTRT-Introns in «Minigenen» zur verbesserten Expression von hTRT-Proteinen in eukaryotischen Zellen eingeschlossen.

Ein verwandter Aspekt der vorliegenden Erfindung betrifft die Bereitstellung von Polynucleotiden, die hTRT-Proteine oder Proteinfragmente codieren, dazu zählen modifizierte und geänderte hTRT-Polypeptide und Varianten der hTRT-Polypeptide. In einer Ausführungsform weist das codierte hTRT-Protein oder Fragment eine wie in SEQ. ID. Nr. 2 (Fig. 17) gezeigte Aminosäuresequenz auf oder eine Aminosäuresequenz mit konservativen Austauschen der SEQ. ID. Nr. 2. In einer Ausführungsform weisen das codierte hTRT-Protein oder -Fragment Austausche auf, die eine Aktivität des Proteins (z.B. katalytische Aktivität von Telomerase) aufweisen. Natürlich müssen aufgrund der Degeneriertheit des genetischen Codes die das hTRT-Protein codierenden Nucleinsäuren nicht die Sequenz eines natürlich vorkommenden hTRT-Gens aufweisen, d.h. eine Vielzahl von Polynucleotiden kann ein hTRT-Polypeptid mit einer Aminosäuresequenz von SEQ. ID. Nr. 2 codieren. Die vorliegende Erfindung stellt jede mögliche Variation von Nucleotidsequenzen bereit, die durch die Auswahl von Kombinationen hergestellt werden, die auf der Auswahl möglicher Codons in Übereinstimmung mit dem bekannten genetischen Triplet-Code basieren. All diese Variationen sind hiermit ausdrücklich offenbart. Zwar sind somit in einigen Fällen hTRT-Polypeptid codierende Nucleotidsequenzen, die mit den Nucleotidsequenzen der natürlich vorkommenden Sequenz (unter entsprechend ausgewählten Bedingungen der Stringenz) hybridisieren können, bevorzugt, es kann jedoch in anderen Fällen vorteilhaft sein, hTRT-codierende Nucleotidsequenzen herzustellen, die eine im wesentlichen unterschiedliche Condonverwendung aufweisen.

In bestimmten Ausführungsformen stellt die Erfindung hTRT-Oligo- und -Polynucleotide bereit, die eine Untersequenz einer hier offenbarten hTRT-Nucleinsäure umfassen (z.B. SEQ. ID. Nr. 1, 4, 6 und 7). Die erfindungsgemässen Nucleinsäuren umfassen typischerweise mindestens etwa 10, bevorzugt mindestens etwa 12 oder etwa 15 aufeinanderfolgende Basen des erläuterten hTRT-Polynucleotids auf. Oft umfassen die erfindungsgemässen Nucleinsäuren auch eine längere Sequenz, beispielsweise eine Sequenz mit einer Länge von mindestens etwa 25, etwa 50, etwa 100, etwa 200 oder mindestens etwa 500 Basen, beispielsweise wenn die Expression eines Polypeptids angestrebt wird. In einigen Ausführungsformen der vorliegenden Erfindung unterscheidet sich das hTRT-Polynucleotid von einem Polynucleotid mit der Sequenz von EST AA281296 (SEQ. ID. Nr. 8).

Weitere Ausführungsformen der vorliegenden Erfindung stellen « $\Delta$ 182hTRT»-Polynucleotide bereit mit einer Sequenz, die natürlich vorkommende oder nicht natürlich vorkommende hTRT-Polynucleotide codieren, beispielsweise SEQ. ID. Nr. 3 oder SEQ. ID. Nr. 4, die nicht die in pGRN121 aufgefundene 182 Basenpaarsequenz (SEQ. ID. Nr. 9 (Fig. 24)), die in Clon 712562 ebenfalls fehlt) enthalten. Diese Polynucleotide sind teilweise von Interesse, da sie Polypeptide codieren, die Kombinationen von TRT-Motiven enthalten, die sich von dem in hTRT-Polypeptid mit vollständiger Länge gefundenen (SEQ. ID. Nr. 2), beispielsweise dem von pGRN121 codierten Polypeptid, unterscheiden. Wie nachstehend diskutiert, wird davon ausgegangen, dass diese Polypeptide in der Natur eine biologische Rolle spielen können (z.B. bei der Regulation der Expression von Telomerase in Zellen) und/oder als Arzneimittel Verwendung finden können (z.B. als dominant-negative Produkte, die die Funktion des Wildtyp-Proteins hemmen) oder dass diese Polypeptide weitere Rollen und Verwendungen, beispielsweise die hier beschriebenen, aufweisen.

Beispielsweise codiert Clon 712562 im Gegensatz zu dem Clon pGRN121 ein Protein mit 259 Aminosäureresten und einem geschätzten Molekulargewicht von ungefähr 30 kD (nachstehend als «712562 hTRT» bezeichnet. Das 712562 hTRT-Polypeptid (SEQ. ID. Nr. 10 (Fig. 19)) enthält die Motive T, 1, 2 und A, jedoch nicht die Motive B, C, D und E. In ähnlicher Weise kann eine Variante des hTRT-Polypeptids mit therapeutischen und weiteren Aktivitäten von einer Nucleinsäure exprimiert werden, die der pGRN121-cDNA gleicht, der jedoch die 182 Basenpaare fehlen, die der Clon 712562 nicht aufweist, beispielsweise mit der Sequenz SEQ. ID. Nr. 4. Diese Nucleinsäure (nachstehend mit «pro90hTRT» bezeichnet), die unter Verwendung von Routine-Syntheseverfahren oder rekombinanten Verfahren, wie sie

hier beschrieben sind, synthetisiert werden kann, codiert ein Protein mit 807 Aminosäureresten (geschätzt s Molekulargewicht etwa 90 kD), das dieselben Amino-terminalen Sequenzen wie das von SEQ. ID. Nr. 1 codierte hTRT-Protein aufweist, j doch am Carboxy-terminalen Bereich abweicht (die ersten 763 Aminosäurereste haben beide Proteine gemeinsam, die letzten 44 Aminosäurereste von pro90hTRT unterscheiden sich von dem hTRT mit vollständiger Länge). Das pro90hTRT-Polypeptid enthält die Motive T, 1, 2 und A, nicht jedoch die Motive B, C, D und E und kann daher einige, jedoch nicht alle Telomerase-Aktivitäten aufweisen.

#### C) Herstellung von menschlichen TRT-Nucleinsäuren

Für die erfindungsgemässen Polynucleotide ergeben sich zahlreiche Anwendungen. Dazu zählen, allerdings ohne Beschränkung darauf, die Expression von Polypeptiden, die hTRT oder Fragmente davon codieren, die Verwendung als «sense»- oder «antisense»-Sonden oder Primer zur Hybridisierung und/oder Amplifikation von natürlich vorkommenden hTRT-Genen oder RNAs (z.B. für diagnostische oder prognostische Anwendungen) und als Arzneimittel (z.B. in «antisense»-, Triplex- oder Ribozym-Zusammensetzungen). Nach Lektüre dieser Offenbarung ist offensichtlich, dass diese Anwendungsmöglichkeiten eine gewaltige Auswirkung auf die Diagnose und die Behandlung von menschlichen Erkrankungen, die sich auf Alterung, Krebs und Fruchtbarkeit beziehen, und darüber hinaus auf das Wachstum, die Reproduktion und die Herstellung von Produkten, die auf Zellen basieren, haben. Wie in den nachstehenden Abschnitten beschrieben, können die erfindungsgemässen hTRT-Nucleinsäuren unter Verwendung bekannter Techniken (z.B. durch Clonierung, Synthese oder Amplifikation) hergestellt werden.

##### 1) Clonierung, Amplifikation und Rekombinante Herstellung

In einer Ausführungsform werden hTRT-Gene oder cDNAs unter Verwendung einer Nucleinsäuresonde cloniert, die an hTRT-mRNA, cDNA oder genomische DNA spezifisch hybridisiert. Eine für diesen Zweck geeignete Probe ist ein Polynucleotid mit der Sequenz, die in SEQ. ID. Nr. 1 bereitgestellt wird oder eine Untersequenz davon. Typischerweise wird die genomische DNA oder cDNA mit dem Ziel-hTRT in einen Vektor ligiert (z.B. ein Plasmid, Phage, Virus, künstliches Hefechromosom etc.) und sie kann in einer genomischen Bank oder cDNA-Bank (z.B. einer cDNA-Bank von menschlicher Plazenta) gefunden werden. Nachdem eine hTRT-Nucleinsäure identifiziert ist, kann sie gemäss dem Fachmann bekannten Standardverfahren isoliert werden. Ein das Screenen einer menschlichen cDNA-Bank nach dem hTRT-Gen veranschaulichendes Beispiel ist Beispiel 1; ein ähnliches Beispiel, das sich auf das Screenen einer menschlichen genomischen Bank bezieht, ist Beispiel 4. Clonierungsverfahren sind allgemein bekannt und beispielsweise in Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd Ed., Vols. 1-3, Cold Spring Harbor Laboratory, (1989); Berger und Kimmel, Methods In Enzymology, Vol. 152: Guide To Molecular Cloning Techniques, San Diego: Academic Press, Inc. (1987); Ausubel et al., Current Protocols in Molecular Biology, Green Publishing and Wiley-Interscience, New York (1997); Cashion et al., US-Patent Nr. 5 017 478; und Carr. EP-B1 0 246 864, beschrieben.

Die Erfindung stellt ferner genomische hTRT-Nucleinsäuren oder cDNA-hTRT-Nucleinsäuren zur Verfügung, die durch Amplifikationsverfahren wie z.B. die Polymerasekettenreaktion (PCR), isoliert wurde, zur Verfügung. In einer Ausführungsform wird die das hTRT-Protein codierende Sequenz aus einer RNA-Probe oder cDNA-Probe amplifiziert (z.B. doppelsträngige Plazenta-cDNA (Clontech, Palo Alto CA) unter Verwendung der Primer

##### Primer

5'-GTGAAGGCACTGTTTCAGCG-3' ("TCP1.1") und

5'-CGCGTGGGTGAGGTGAGGTG-3 ("TCP1.15").

In einigen Ausführungsformen kann ein dritter Primer oder ein zweites Primerpaar verwendet werden, beispielsweise für «nested PCR» zur Erhöhung der Spezifität. Ein Beispiel eines zweiten Primerpaares ist

5'-CTGTGCTGGGCCTGGACGATA-3' ("billTCP6") und

5'-AGCTTGTTCTCCATGTCGCCGTAG-3' ("TCP1.14").

Für den Fachmann ist es offensichtlich, dass zahlreiche andere Primer und Primerkombinationen, die für die Amplifikation von hTRT-Nucleinsäuren von Nutzen sind, durch die vorliegende Erfindung bereitgestellt werden.

Darüber hinaus stellt die Erfindung Primer zur Verfügung, die einen beliebigen spezifischen Bereich amplifizieren (beispielsweise codierende Bereiche, Promotorbereiche und/oder Introns) oder eine Unter-

sequenz genomischer hTRTDNA, cDNA oder RNA. Beispielsweise kann das hTRT-Intron an der Position 274/275 von SEQ. ID. Nr. 1 (siehe Beispiel 3) amplifiziert werden (z.B. zum Nachweis genomischer Clone) unter Verwendung der Primer TCP1.57 und TCP1.52 (Primerpaar 1) oder der Primer TCP1.49 und TCP1.50 (Primerpaar 2). (Die Bezeichnungen für die Primer beziehen sich auf die in der nachstehenden Tabelle 2 aufgelisteten Primer). Die Primerpaare können individuell oder in einer «nested PCR» verwendet werden, in der der Primersatz 1 zuerst verwendet wird. Ein weiteres veranschaulichendes Beispiel bezieht sich auf Primer, die spezifisch das 5'-Ende der hTRT-mRNA oder das Exon, das das 5'-Ende des hTRT-Gens codiert, amplifizieren und somit nachweisen (z.B. um die Grösse oder die Vollständigkeit eines cDNA-Clons zu beurteilen). Die folgenden Primerpaare sind zur Amplifikation des 5-Endes von hTRT von Nutzen: Primer K320 und K321 (Primerpaar 3); Primer K320 und TCP1.61 (Primerpaar 4); Primer K320 und K322 (Primerpaar 5). Die Primersätze können in einer «nested PCR» in der Reihenfolge Satz 5, dann Satz 4 oder Satz 3, oder Satz 4 und dann Satz 3 verwendet werden. Ein weiteres veranschaulichendes Beispiel betrifft Primer, die zur spezifischen Amplifikation oder zum spezifischen Nachweis des konservierten hTRT-TRT-Motivbereichs ausgewählt wurden, der etwa das mittlere Drittel der mRNA umfasst (z.B. zur Verwendung als Hybridisierungssonde zur Identifizierung von TRT-Clonen aus nicht-menschlichen Organismen). Die folgenden Primerpaare sind zur Amplifikation des TRT-Motivbereichs von hTRT-Nucleinsäuren von Nutzen: Primer K304 und TCP1.8 (Primerpaar 6), oder Primer LT1 und TCP1.15 (Primerpaar 7). Die Primersätze können in einem Experiment mit «nested PCR» in der Reihenfolge Satz 6, dann Satz 7 verwendet werden.

Geeignete Bedingungen für die PCR-Amplifikation sind dem Fachmann bekannt. Dazu gehören (ohne Beschränkung darauf) 1 Einheit Taq-Polymerase (Perkin Elmer, Norwalk CT), jeweils 100 µM dNTP (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), 1 x PCR-Puffer (50 mM KCl, 10 mM Tris, pH-Wert 8,3 bei Raumtemperatur, 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,01% Gelatine) und 0,5 µM Primer, wobei die Amplifikation etwa 30 Cyclen bei 94°C für 45 Sekunden, 55°C für 45 Sekunden und 72°C für 90 Sekunden umfasst. Es ist für den Fachmann offensichtlich, dass andere thermostabile DNA-Polymerasen, Reaktionsbedingungen und Parameter bezüglich der Cyclen ebenfalls eine geeignete Amplifikation liefern. Weitere geeignete Verfahren für die Amplifikation in vitro, die zum Erhalt von hTRT-Nucleinsäuren verwendet werden können, umfassen, jedoch ohne Beschränkung darauf, die nachstehend beschriebenen Verfahren. Nach Amplifikation können die hTRT-Nucleinsäuren, falls erwünscht, unter Verwendung von Routineverfahren der Molekularbiologie in einer Vielzahl von Vektoren cloniert werden, nachgewiesen oder auf andere Art und Weise in Übereinstimmung mit den erfindungsgemässen Verfahren angewandt werden.

Es ist dem Fachmann bewusst, dass die wie vorstehend beschrieben erhaltenen clonierten oder amplifizierten hTRT-Nucleinsäuren unter Verwendung weiterer Verfahren hergestellt oder vermehrt werden können, beispielsweise durch chemische Synthese oder Replikation durch Transformation in bakterielle Systeme wie beispielsweise *E. coli* (siehe beispielsweise Ausubel et al., a.a.O.) oder eukaryotische Expressionssysteme, beispielsweise Säuger-Expressionssysteme. In ähnlicher Weise kann hTRT-RNA in Übereinstimmung mit den erfindungsgemässen in vitro-Verfahren oder in bakteriellen Systemen wie *E. coli* exprimiert werden, beispielsweise ohne Verwendung von im Handel erhältlichen Vektoren, die Promotoren enthalten, die von einer RNA-Polymerase erkannt werden, wie beispielsweise T7, T3 oder SP6 oder durch Transkription von DNA, die durch PCR-Amplifikation erzeugt wurde, unter Verwendung von Primern, die einen RNA-Polymerase-Promotor enthalten.

Die vorliegende Erfindung stellt ferner veränderte oder modifizierte hTRT-Nucleinsäuren bereit. Für den Fachmann ist es offensichtlich, dass die erhaltenen clonierten oder amplifizierten hTRT-Nucleinsäuren durch allgemein bekannte Verfahren (z.B. ortsgerichtete Mutagenese, «Linker-Scanning»-Mutagenese) modifiziert werden können, beispielsweise verkürzt, derivatisiert, verändert), oder einfach de novo, wie nachstehend beschrieben, synthetisiert werden können. Die veränderten oder modifizierten hTRT-Nucleinsäuren sind für eine Vielzahl von Anwendungsmöglichkeiten von Nutzen, zu denen ohne Beschränkung darauf die Erleichterung der Clonierung, die Manipulation eines hTRT-Gens oder Genprodukts oder die Expression einer Variante eines hTRT-Genprodukts gehören. In einer Ausführungsform wird beispielsweise die hTRT-Gensequenz so verändert, dass sie ein hTRT-Polypeptid mit veränderten Eigenschaften oder Aktivitäten codiert, wie dies ausführlich nachstehend diskutiert wird, beispielsweise durch Mutation in einem konservierten Motiv von hTRT. In einem weiteren veranschaulichenden Beispiel können die Mutationen in dem das Protein codierenden Bereich einer hTRT-Nucleinsäure zur Veränderung des Glykosylierungsmusters, zur Veränderung von Codon-Präferenzen, zur Herstellung von Spleiss-Varianten, zur Entfernung von Protease-empfindlichen Stellen, zur Erzeugung von antigenen Domänen, zur Modifikation der spezifischen Aktivität etc. eingeführt werden. In weiteren Ausführungsformen wird die hTRT und seine Derivate codierende Sequenz ohne Änderung der codierten Aminosäuresequenzen verändert, beispielsweise zur Herstellung von RNA-Transkripten mit mehr erwünschten Eigenschaften, wie beispielsweise erhöhte Translationseffizienz oder eine grössere oder kürzere Halbwertszeit im Vergleich zu Transkripten, die von der natürlich vorkommenden Sequenz hergestellt wurden. In einer weiteren Ausführungsform werden zur Erhöhung der Expressionsrate des Peptids in einem speziellen prokaryotischen oder eukaryotischen Expressionswirt gemäss der Frequenz, mit der bestimmte Codons von dem Wirt verwendet werden, veränderte Codons ausgewählt. Nützliche in vitro und in vivo-Rekombinationsverfahren, die zur Herstellung der erfindungsgemässen hTRT-Polynucleotidvarianten verwendet werden können, können in Sambrook et al. und Ausubel et al., a.a.O., gefunden werden.

Wie bereits vorstehend erwähnt, stellt die vorliegende Erfindung Nucleinsäuren mit flankierenden (5' oder 3') und Intron-Sequenzen des hTERT-Gens bereit. Die Nucleinsäuren sind u.a. deshalb von Interesse, da sie Promotoren und weitere regulatorische Elemente enthalten, die an der hTERT-Regulation beteiligt und zur Expression von hTERT und anderer rekombinanter Proteine oder RNA-Genprodukte von Nutzen sind. Es ist offensichtlich, dass zusätzlich zu den in SEQ. ID. Nr. 6 (Fig. 17) und 7 bereitgestellten Nucleinsäuresequenzen zusätzliche hTERT-Intronsequenzen und flankierende Sequenzen unter Verwendung von Routineverfahren der Molekularbiologie einfach erhalten werden können. Beispielsweise kann eine zusätzliche genomische hTERT-Sequenz durch weitere Sequenzierung des Lambda-Clons GØ5, der vorstehend und in Beispiel 4 beschrieben ist, erhalten werden. Darüber hinaus können weitere genomische hTERT-Clone und Sequenzen durch Screenen einer menschlichen genomischen Bank unter Verwendung einer hTERT-Nucleinsäuresonde mit einer Sequenz oder Untersequenz von SEQ. ID. Nr. 1 erhalten werden. Weitere Clone und Sequenzen (z.B. noch weiter stromaufwärts) können unter Verwendung von markierten Sequenzen oder Subclonen, die von  $\lambda$ GØ5 stammen, zum Absuchen geeigneter Genbanken erhalten werden. Andere nützliche Verfahren zur weiteren Charakterisierung von flankierenden hTERT-Sequenzen sind die allgemeinen Verfahren, die von Gobinda et al., PCR Meth. Applic. 2 (1993), 318; Triglia et al., Nucleic Acids Res. 16 (1988), 8186; Lagerstrom et al., PCR Methods Applic. 1 (1991), 111; und Parker et al., Nucleic Acids Res. 19 (1991), 3055, beschrieben werden.

Intron-Sequenzen können durch Routinemittel identifiziert werden, beispielsweise durch Vergleich der genomischen hTERT-Sequenz mit hTERT-cDNA-Sequenzen (siehe beispielsweise Beispiel 3), durch S1-Analyse (siehe Ausubel et al., a.a.O.; Kapitel 4), oder zahlreiche weitere auf dem Fachgebiet bekannte Mittel. Intron-Sequenzen können auch in prä-mRNA (d.h. ungespleissten oder unvollständig gespleissten mRNA-Vorläufern) gefunden werden. Diese können amplifiziert oder nach reverser Transkription von zellulärer RNA cloniert werden.

Falls erwünscht, kann die clonierte, amplifizierte oder anderweitig synthetisierte hTERT-Nucleinsäure oder andere TRT-Nucleinsäure bestimmt oder unter Verwendung von allgemein bekannten Verfahren für die DNA-Sequenzierung verifiziert werden (siehe beispielsweise Ausubel et al., a.a.O.) Bei den nützlichen Sequenzierungsverfahren werden Enzyme wie beispielsweise das Klenow-Fragment der DNA-Polymerase I, Sequenase (US Biochemical Corp., Cleveland OH), Taq DNA-Polymerase (Perkin Elmer, Norwalk CT), thermostabile T7-Polymerase (Amersham, Chicago IL), oder Kombinationen von rekombinanten Polymerasen und Exonucleasen mit "proofreading"-Aktivität angewandt, beispielsweise das ELONGASE-Amplifikations-System, das von Gibco BRL (Gaithersburg MD) erhältlich ist. Zur Sequenzierung oder Verifizierung der Sequenz von Oligonucleotiden, (wie z.B. Oligonucleotiden, die durch die de novo-chemische Synthese hergestellt wurden) wird das Verfahren von Maxam und Gilbert bevorzugt (Maxam und Gilbert, Meth. Enz. 65 (1980), 499; Ausubel et al., a.a.O., Kapitel 7).

Die 5'-untranslatierten Sequenzen von hTERT oder anderen TRT-mRNAs können durch Clonierung einer hTERT mit «vollständiger Länge» oder einer anderen cDNA unter Verwendung von Standardverfahren wie der reversen Transkription von mRNA und im Anschluss daran durch Clonierung und Sequenzierung der erhaltenen cDNA direkt bestimmt werden. Bevorzugte durch oligo(dT)-«priming» erhaltene Genbanken zum Screenen oder Amplifizieren von cDNAs mit vollständiger Länge, die zum Einschluss grösserer cDNAs nach Grösse selektiert wurden, werden bevorzugt. Durch «Zufalls-Priming» erhaltene Genbanken sind ebenfalls geeignet. Diese enthalten oft einen grösseren Anteil von Clonen, die 5'-Bereiche von Genen enthalten. Es können weitere allgemein bekannte Verfahren zum Erhalt von 58-RNA-Sequenzen verwendet werden, beispielsweise das von Frohman et al., Proc. Nat. Acad. Sci., USA 85 (1988), 8998, beschriebene RACE-Protokoll. Falls erwünscht, kann die Transkriptions-Startstelle einer hTERT oder einer anderen TRT-mRNA durch Routineverfahren unter Verwendung der hier bereitgestellten Nucleinsäuren (z.B. solcher mit der Sequenz von SEQ. ID. Nr. 1) bestimmt werden. Ein Verfahren ist die S1-Nuclease-Analyse (Ausubel et al., a.a.O.), bei der eine markierte DNA mit einer Sequenz des 5'-Bereichs von SEQ. IDNr. 1 verwendet wird.

## 2) Chemische Synthese von Nucleinsäuren

Die vorliegende Erfindung stellt auch hTERT-Polynucleotide (RNA, DNA oder modifiziert) bereit, die durch direkte chemische Synthese hergestellt werden. Chemische Synthese wird im allgemeinen für die Herstellung von Oligonucleotiden oder von Oligonucleotiden und Polynucleotiden, die Nicht-Standardnucleotide enthalten (z.B. Sonden, Primer und «antisense»-Oligonucleotide) bevorzugt. Die direkte chemische Synthese von Nucleinsäuren kann durch auf dem Fachgebiet bekannte Verfahren erfolgen, beispielsweise durch das Phosphotriester-Verfahren von Narang et al., Meth. Enzymol. 68 (1979), 90; das Phosphodiester-Verfahren von Brown et al., Meth. Enzymol. 68 (1979), 109; das Diethylphosphoramidit-Verfahren von Beaucage et al., Tetra. Lett. 22 (1981), 1859; und das Verfahren des US-Patents Nr. 4 458 066, bei dem ein fester Träger verwendet wird. Durch die chemische Synthese wird typischerweise ein einzelsträngiges Oligonucleotid hergestellt, das durch Hybridisierung mit einer komplementären Sequenz oder durch Polymerisation mit einer DNA-Polymerase und eines Oligonucleotidprimers unter Verwendung des Einzelstrangs als Matrize in eine doppelsträngige DNA umgewandelt werden kann. Der Fachmann ist sich dessen bewusst, dass zwar die chemische Synthese von DNA oft auf Sequen-

zen von etwa 100 oder 150 Basen beschränkt ist, längere Sequenzen jedoch durch Ligierung der kürzeren Sequenzen oder durch ausgefeiltere Syntheseverfahren erhalten werden können.

Die erfindungsgemässen hTTRT-Polynucleotide und Oligonucleotide (oder hTTRT- oder weitere Polynucleotid oder Oligonucleotide) können unter Verwendung von Nicht-Standardbasen (z.B. solche, die sich von Adenin, Cytidin, Guanin, Thymin und Uridin unterscheiden) oder Nicht-Standard-Rückgratstrukturen zur Erzielung gewünschter Eigenschaften (z.B. erhöhte Nuclease-Resistenz, engere Bindung, Stabilität oder ein gewünschter TM) hergestellt werden. Zu den für die Herstellung von Nuclease-resistenten Oligonucleotiden zählen die in der PCT-Veröffentlichung WO 94/12 633 beschriebenen Verfahren. Eine grosse Anzahl von nützlichen modifizierten Oligonucleotiden kann hergestellt werden, dazu zählen Oligonucleotide mit einem Peptid-Nucleinsäure (PNA)-Rückgrat (Nielsen et al., Science 254 (1991), 1497) oder der Einbau von 2'-O-Methylribonucleotiden, Phosphorthioat-Nucleotiden, Methylphosphonat-Nucleotiden, Phosphotriester-Nucleotiden, Phosphorthioat-Nucleotiden und Phosphoramidaten. Weitere nützliche Oligonucleotide können Alkyl- und Halogen-substituierte Zuckeranteile enthalten, die an der 2'-Position eine der folgenden Gruppen enthalten: OH, SH, SCH<sub>3</sub>, F, OCN, OCH<sub>3</sub>OCH<sub>3</sub>, OCH<sub>3</sub>O(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>CH<sub>3</sub>, O(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>NH<sub>2</sub> oder O(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>CH<sub>3</sub>, wobei n von 1 bis etwa 10 ist; C1 bis C10-Niederalkyl, substituiertes Niederalkyl, Alkaryl oder Aralkyl; Cl; Br; CN; CF<sub>3</sub>; OCF<sub>3</sub>; O-, S-, oder N-Alkyl; O-, S-, oder N-Alkenyl; SOCH<sub>3</sub>, SO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>; ONO<sub>2</sub>; NO<sub>2</sub>; N<sub>3</sub>, NH<sub>2</sub>; Heterocycloalkyl; Heterocycloalkaryl; Aminoalkylamino; Polyalkylamino, substituiertes Silyl; eine RNA-spaltende Gruppe, eine Cholesteringruppe, eine Folatgruppe, eine Reportergruppe, ein Intercalator, eine Gruppe zur Verbesserung der pharmakokinetischen Eigenschaften eines Oligonucleotids; oder eine Gruppe zur Verbesserung der pharmacodynamischen Eigenschaften eines Oligonucleotids und weiterer Substituenten mit ähnlichen Eigenschaften. Folat, Cholesterin und weitere Gruppen, die die Aufnahme des Oligonucleotids erleichtern, wie beispielsweise Lipid-Analoga, können direkt oder über einen Linker an der 2'-Position jedes Nucleosids oder an der 3'- oder 5'-Position des 3'-terminalen bzw. 5'-terminalen Nucleosids konjugiert werden. Es können eines oder mehrere solcher Konjugate verwendet werden. Oligonucleotide können auch Zucker «mimetics» aufweisen, beispielsweise Cyclobutyle anstelle der Pentofuranosylgruppe. Weitere Ausführungsformen können mindestens eine modifizierte Basenform oder eine «universelle Base» wie Inosin beinhalten oder den Einschluss von anderen Nicht-Standardbasen wie Queosin und Wybutosin sowie Acetyl-, Methyl-, Thio- und ähnlich modifizierte Formen von Adenin, Cytidin, Guanin, Thymin und Uridin, die von Endonucleasen nicht so leicht erkannt werden. Die Erfindung stellt ferner Oligonucleotide mit Rückgratanalogen bereit, dazu gehören Phosphodiester, Phosphorthioat, Phosphordithioat, Methylphosphonat, Phosphoramidat, Alkylphosphotriester, Sulfamat, 3'-Thioacetyl, Methylen(methylimino), 3'-N-Carbamat, Morpholincarbamat, Chiral-Methylphosphonate, Nucleotide mit kurzketigen Alkyl- oder Cycloalkylverknüpfungen zwischen den Zuckern, kurzketige Verknüpfungen («Rückgratverknüpfungen») zwischen den Zuckern mit unterschiedlichen Atomen oder solche die heterocyclisch sind oder CH<sub>2</sub>-NH-OCH<sub>2</sub>, CH<sub>2</sub>-N(CH<sub>3</sub>)-OCH<sub>2</sub>, CH<sub>2</sub>-N(CH<sub>3</sub>)-CH<sub>2</sub>, CH<sub>2</sub>-N(CH<sub>3</sub>)-N(CH<sub>3</sub>)-CH<sub>2</sub> und O-N(CH<sub>3</sub>)-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-Rückgrate (wobei Phosphodiester O-P-O-CH<sub>2</sub> ist), oder Mischungen dieser Verbindungen. Von Nutzen sind ausserdem Oligonucleotide mit Morpholino-Rückgrat-Struktur (US-Patent Nr. 5 034 506).

Zur weiteren nützlichen Literatur zählt: Oligonucleotides and Analogues, A Practical Approach, F. Eckstein (Herausg.) IRL Press bei Oxford University Press (1991); Antisense Strategies, Annals of the New York Academy of Sciences, Bd. 600, Baserga und Denhardt (Herausg.) (NYAS 1992), Milligan et al., J. Med. Chem. 36 (14) (9. Juli 1993), 1923-1937; Antisense Research and Applications (1993, CRC Press) die gesamte Veröffentlichung und speziell Kapitel 15 von Sanghvi, mit dem Titel «Heterocyclic base modifications in nucleic acids and their applications in antisense oligonucleotides.» Antisense Therapeutics, Sudhir Agrawal (Herausgeber (Humana Press, Totowa, New Jersey, 1996).

#### D) Die Markierung von Nucleinsäuren

Es ist oft von Nutzen, die erfindungsgemässen Nucleinsäuren zu markieren, beispielsweise wenn die hTTRT oder andere Oligonucleotide oder Polynucleotide als Nucleinsäuresonden verwendet werden sollen. Die Markierungen (siehe nachstehend) können durch beliebige, dem Fachmann allgemein bekannte Mittel eingebaut werden. In einer Ausführungsform wird eine nicht-amplifizierte Nucleinsäure (z.B. mRNA, poly-A-mRNA, cDNA) markiert. Mittel zur Herstellung markierter Nucleinsäuren sind dem Fachmann allgemein bekannt. Dazu gehören beispielsweise Nick-Translation, Markierung mittels «Zufalls-Priming», Endmarkierung (z.B. unter Verwendung einer Kinase) und chemische Konjugation (z.B. Photobiotinylierung). In einer weiteren Ausführungsform wird die Markierung gleichzeitig während eines Amplifikations-schritts bei der Herstellung der Proben-Nucleinsäuren eingebaut. Somit liefern beispielsweise die Polymerasekettenreaktion (PCR) oder andere Nucleinsäureamplifikationsverfahren mit markierten Primern oder markierten Nucleotiden ein markiertes Amplifikationsprodukt. In einer weiteren Ausführungsform wird durch Transkriptionsamplifikation unter Verwendung eines markierten Nucleotids (z.B. Fluorescein-markiertes UTP und/oder CTP) eine Markierung in die transkribierten Nucleinsäuren eingebaut. Ein Amplifikationsprodukt kann auch oder alternativ nach Beendigung der Amplifikation markiert werden.



## E) Beispiele für Oligonucleotide

Wie bereits vorstehend angemerkt und nachstehend ausführlich diskutiert werden Oligonucleotide für eine Vielzahl von Verwendungsmöglichkeiten verwendet, beispielsweise als Primer, Sonden, therapeutische oder andere «antisense»-Oligonucleotide und Triplex-Oligonucleotide. Zahlreiche weitere Verwendungsmöglichkeiten ergeben sich aus der vorliegenden Beschreibung. Tabelle 2 veranschaulicht bestimmte spezifische Oligonucleotide, die bei der Ausführung der Erfindung verwendet werden können. Natürlich können zahlreiche weitere nützliche erfindungsgemässe Oligonucleotide durch den Fachmann anhand der hier zur Verfügung gestellten Lehre synthetisiert werden.

In Tabelle 2 bedeutet «seq», dass der Primer zur Sequenzierung verwendet wurde oder dafür von Nutzen ist; «PCR» bedeutet, dass der Primer zur PCR verwendet wurde oder dafür von Nutzen ist; «AS» bedeutet, dass der Primer zur «antisense»-Hemmung von Telomerase-Aktivität verwendet wurde oder dafür von Nutzen ist; «CL» bedeutet, dass der Primer zur Clonierung von Bereichen von hTERT-Genen oder RNA verwendet wurde oder dafür von Nutzen ist; «mut» bedeutet, dass der Primer zur Konstruktion von Mutanten von hTERT-Genen oder Genprodukten verwendet wurde oder für von Nutzen ist. «UC» bedeutet «Upper case» [Grossschreibung], und «lc» bedeutet «lower case» [Kleinschreibung]. Fehlpaarungen und Insertionen (relativ zu SEQ. ID Nr. 1) sind unterstrichen; Deletionen werden durch ein «-» angegeben. Selbstverständlich soll keine der Angaben in Tabelle 2 eine Einschränkung der Verwendung eines bestimmten Oligonucleotids auf irgendeine Einzelverwendung oder einen Satz von Anwendungsmöglichkeiten beschränken.

primär	5'-Sequenz-3'	Anmerkungen	Verwendung					
			Fehlplanung 2°	scu	PCR	ΔS	CL	MUT
TCPI.1	GTGAAGGCACAGTTCACGG			x	x			
TCPI.2	GTGGATGATTCTTGTTGG			x	x			
TCPI.4	CTGGACACTCAGCCCTTGG			x	x			
TCPI.5	GGCAGGTGCTGGACACT			x	x			
TCPI.6	TTTGATGATGCTGGCGATG			x	x			
TCPI.7	GGGGCTCGTCTTCTACAGG		Y	x	x			
TCPI.8	CAGCAGGAGGATCTTGTAG			x	x			
TCPI.9	TGACCCAGGAGTGGCAGG			x	x			
TCPI.10	TCAAGCTGACTCGACACCG			x	x			
TCPI.11	CGGCGTGACAGGGCTGC			x	x			
TCPI.12	GCTGAAGGCTGAGTGTCC			x	x			
TCPI.13	TAGTCCATGTTACACAATCG			x	x			
TCPI.14	CTGTGCTGGCCTGGACGATA			x	x			
TCPI.15	CGCGTGGGTGAGGTGAGGTG			x	x			
TCPI.16	TTTCCGTGTTGAGTGTTTC			x	x			
TCPI.17	GTCACCGTGTGGGCAGG			x	x			
TCPI.19	GCTACCTGCCCAACACGG			x	x			
TCPI.20	GCGCGAAGAACGTGCTGG			x	x			
TCPI.21	CA-CTGCTCCTTGTGCGCTG		Y	x	x			
TCPI.22	TTCCCAAGGACTTTGTTGC			x	x			
TCPI.24	TGTTCTCAAGACCGCACTG		Y	x	x			
TCPI.25	TACTGCGTGGTCGGTATG			x	x			
TCPI.26	GGTCTTGGGGCTGAAGTGT			x	x			
TCPI.27	TGGTTCACCTGCTGGCAGG			x	x			
TCPI.28	GTGGTTTCTGTGTTGTTGC			x	x			
TCPI.29	GACACCACACAGAAACCCAC			x	x			
TCPI.30	GTGCCAGCAGGTGAACCCAG			x	x			
TCPI.32B	GCAGTGGCTCTTGAGGAGC			x	x			
TCPI.33	TGGAACCATAGCGTCAGGGAG			x	x			
TCPI.34	GGCCTCCCTGACGCTATGGTT			x	x			
TCPI.35	GC(GT)CGGCGCTGCCACTCAGG			x	x			
TCPI.35f	GCTCGGCGCTGCCACTCAGG			x	x			
TCPI.36	ACGCCGAGACCAAGCACTTC			x	x			

TCPI.38	CAAAGAGGTGGCTTCTTCG	X	X
TCPI.39	AAGCCACGACGTTCTTCGC	X	X
TCPI.40	CACGTTCTGCGGCGCCTG	X	X
TCPI.41	CCTTCAACCACAGCTGCGG	X	X
TCPI.42	GGCGACGACGTGCTGGTTC	X	X
TCPI.43	GGCTCAGGGGCAGCGCCAC	X	X
TCPI.44	CTGGCAGGTGTACGGCTTC	X	X
TCPI.45	GGTGAGCCGAGTGACCTGGTTTC	X	X
TCPI.46	GACGTGTGGCCGCGATGTGG	X	X
TCPI.47	GAAGTGTGCGTTGCCAAGAG	X	X
TCPI.48	GACACACACAGAAACCACGGTCAC	X	X
TCPI.49	CGCCCCCTCTTCCGCCAGGT	X	X
TCPI.50	CGAAGCCGAAGGCCACGACGTTCTT	X	X
TCPI.51	GGTGGCCGAGTGCTGCAGAGG	X	X
TCPI.52	GTAGCTGCGCACGCTGGTGGTGAG	X	X
TCPI.53	TGGCGACGACGTGCTGGTTCA	X	X
TCPI.54	TATGTTCCAGGCCGCTCGCATCC	X	X
TCPI.55	CCAGCTGCGCCTACCAGGTGTGC	X	X
TCPI.56	GGCTCCTGACGCTATGTTCCAG	X	X
TCPI.57	GGTGTGCGGCTGGCACGTTCCG	X	X
TCPI.58	TCCCAGGGACGCACACCAAGCACT	X	X
TCPI.59	GTACAGGGCACACCTTTGGTCACTC	X	X
TCPI.60	TCGACGACGTACACACTCATCAGCC	X	X
TCPI.61	AGCGGCACACTCGCGGTAGTGGC	X	X
TCPI.62	CCACCAGTCTTTCAGGCAGGACAC	X	X
TCPI.63	CCAGGGCTTCCCACGTCGCGACGAG	X	X
TCPI.64	CGCACGAACGTGGCCACGCGGCAGCA	X	X
TCPI.65	TGACCGTGTTTCTGTGTGGTGT	X	X
TCPI.66	CCCTCTTCAAGTGTGTCTGATTCC	X	X
TCPI.67	ATCGGGCCACACAGTCCCT	X	X
TCPI.68	TGCTCCAGACACTGGCCGGTAGAA	X	X
TCPI.69	ACGAAGCCGTACACCTGCC	X	X
TCPI.72	CGACATCCCTGCGTTCTTGGCTTTC	X	X
TCPI.73	CACGTGCTGGCCTCATTTCAAGGG	X	X
TCPI.74	GCGACATGGAGAAACAAGC	X	X
TCPI.75	GCAGCCATACTCAGGGACAC	X	X
TCPI.76	CCATCTCTTCCACGCTGCTC	X	X

**Tabelle 2  
(Fortsetzung)**

[illegible]

**Tabelle 2  
(Fortsetzung)**

Accession	Sequence	Annotation	Feature	Value
PE02	CCAGGGCTTCCACACGTGCGCAGCAGGACGCAGCGC			
LM101	CTAGTCTAGATCA / GCTAGCGTAATCTGGAACATCGTA			
	TGGGTA / GTCCAGGATGGTCTTGAAGTC			
LM103	TACCATGGGCTACCCATACGACGTTCCAGATTACGCTCA			
LM104	TATGAGCGTAATCTGGAACGTCGTATGGGTAGCCCATGG			
LM105	GTGTACGTCGTCGAGCTCCTCAGGTCTGCCTTTT			
	ATGTCACGGAG			
LM106	GTGTACGTCGTCGAGCTCCTCAGGTCTTTCGCTTATGTC			
	ACGGAGACC			
LM107	CCTCAGGCTCTTTCTTTGCTGTACGGAGACAACGTTT			
	CATAAGAACAG			
LM108	GGTCTTTCTTTTATGTCTCGCGGAGACAACGTTT			
	CAAAAGAACAG			
LM109	CTTCTCTTTATGTACCGCGCAGCAACGTTTCAAAAGAACAC			
LM_FFYT	ATGAGTGTCAGCTGTCGAGCTCCTCAGGTCTACCCAGC			
	CAAAAGAACAGGCTCTTTTTC			
TCP061:	GGCTGATGAGTGTGTACGTCGTCTGA			
HUM01:	ACGTGGTCTCCGTGACATAAAAGAA			
HUM02:	AGGTCTTTCTTTTATGTACACGGA			
HUM03:	CACAGACCCCGTCGCCTGGTC			
HUM04:	CGGAGTCTGGACGTCAGCAGGGC			
SLW F1N	CGCGGATCGTAACTAAATGCGCGCGCTCCCCGCTGC			
SLW F1C	CGCGAATCGTAACTAAATGCGCGCGCTCCCCGCTGC			
SLW F2N	CGCGGATCGTAACTAAATGCGCGCGCTCCCCGCTGC			
SLW F2C	CGCGAATCGTAACTAAATGCGCGCGCTCCCCGCTGC			
SLW F3N	CGCGGATCGTAACTAAATGCGCGCGCTCCCCGCTGC			

**Tabelle 2**  
**(Forsetzung)**

SLW F3C	SLW F3N / SLW F3C	amplifizieren ein 887 nt Stück von pGRN121 (2426-3274)	UC = hTRT seq, lc = BamHI Stelle + 2 stop Codons für ein GST-Fusionskonstrukt (2426-3274) UC=hTRT seq, lc=EcoR I Stelle +3 stop Codons	
5cggaaatcgtagtactaGATCCCTGGCACTGGACG				x
SLW F4N	SLW F4N / SLW F4C	amplifizieren ein 994 nt Stück von pGRN121 (3272-4177)		
5cggaaatcgtagtactaGATCCCGAGGGCTCCATCCTC				x
SLW F4C	SLW F4N / SLW F4C	amplifizieren ein 994 nt Stück von pGRN121 (3272-4177)		
40-60	GGCATCGCGGGGGTGGCCGGG	Phosphorothioat		x
260-280	GGACACCTGGCGGAGGAGGG	Phosphorothioat		x
500-520	CGTGCCAGCAGGTGAACCAG	Phosphorothioat		x
770-790	CTCAGGGGACGCCACGCCCT	Phosphorothioat		x
885-905	AGGTGGCTTCTTCGGCGGGTC	Phosphorothioat		x
1000-1020	GGACAAAGCGGTGCCAGGGA	Phosphorothioat		x
1300-1320	GCTGGGGTGACCGCAGCTCGC	Phosphorothioat		x
1520-1540	GATGAACCTCTTGGGTTCCT	Phosphorothioat		x
2110-2130	GTGCGCCAGGCCCTGTGGATA	Phosphorothioat		x
2295-2315	GCCCATGGCGGGCTTCTGGA	Phosphorothioat		x
2450-2470	GAGGCCACTGTGGCCTCATTT	Phosphorothioat		x
2670-2690	GGGTGAGGTGAGGTGTACCA	Phosphorothioat		x
3080-3110	GCTGACGACACATGCGTGAACCTGTACGG	Phosphorothioat		x
3140-3160	GACGCGCAGGAAAATGTGGG	Phosphorothioat		x
3690-3710	CCGAGCGCCAGCCTGTGGGA	Phosphorothioat		x
55-75	CAGCGGGGAGCGCGGCATC	Phosphorothioat		x
151-171	CAGCACCTCGCGGTAGTGGCT	Phosphorothioat		x
TP1.1	TCAAGCCAAACCTGAATCTGAG	Phosphorothioat		x
TP1.2	CCCGAGTGAATCTTTCTACGC	Phosphorothioat		x
TP1.3	GTCTCTGGCAGTTTCCTCATCCC	Phosphorothioat		x
TP1.4	TTTAGGCATCCTCCCAAGCACA	Phosphorothioat		x

## IV. TRT-Proteine und Peptide

## A) Allgemeines

Die Erfindung stellt eine grosse Vielzahl von hTRT-Proteinen bereit, die unter anderem zur Hemmung von Telomerase-Aktivität in einer Zelle von Nutzen sind, zur Induktion einer anti-hTRT-Immunantwort, als ein therapeutisches Reagenz, als Standard oder Kontrolle in einem diagnostischen Assay, als ein Ziel beim Screenen nach Aktivierung oder Hemmung einer Aktivität von hTRT oder Telomerase und zahlreiche weitere Anwendungsmöglichkeiten sind entweder hier beschrieben oder für den Fachmann offensichtlich. Zu den erfindungsgemässen hTRT-Proteinen gehören funktionell aktive Proteine (die z.B. zur Übertragung von Telomerase-Aktivität in eine Telomerase-negative Zelle von Nutzen sind) und Varianten, inaktive Varianten (die z.B. zur Hemmung von Telomerase-Aktivität in einer Zelle von Nutzen sind), hTRT-Polypeptide, Proteine und Telomerase-RNPs (z.B. die Proteine umfassenden Ribonucleoproteinkomplexe), die eine, verschiedene oder alle funktionelle Aktivitäten von natürlich vorkommender hTRT und Telomerase aufweisen, wie dies zur Veranschaulichung noch ausführlicher nachstehend diskutiert wird.

In einer Ausführungsform ist das erfindungsgemässe hTRT-Protein ein Polypeptid mit der Sequenz von SEQ. ID. Nr. 2 (Fig. 17) oder ein Fragment davon. In einer weiteren Ausführungsform unterscheidet sich das hTRT-Polypeptid von SEQ. ID. Nr. 2 durch interne Deletion, Insertionen oder konservative Austausche von Aminosäureresten. In einer verwandten Ausführungsform stellt die Erfindung hTRT-Polypeptide bereit, die der SEQ. ID. Nr. 2 im wesentlichen gleichen. Die Erfindung stellt ferner hTRT-Polypeptide bereit, die bezogen auf die Aminosäuresequenz von SEQ. ID. Nr. 2 modifiziert sind, d.h. beispielsweise verkürzt, mutiert, derivatisiert oder an andere Sequenzen fusioniert sind (beispielsweise zur Bildung eines Fusionsproteins). Darüber hinaus stellt die vorliegende Erfindung Telomerase-RNPs bereit, die ein erfindungsgemässes hTRT-Protein umfassen, das mit einer Matrizen-RNA einen Komplex bildet (z.B. hTR). In weiteren Ausführungsformen sind eines oder mehrere Telomerase-assoziierte Proteine mit einem hTRT-Protein und/oder hTR assoziiert.

Die Erfindung stellt auch weitere natürlich vorkommende hTRT-Spezies oder nicht natürlich vorkommende Varianten zur Verfügung, beispielsweise Proteine mit der Sequenz von SEQ. ID. Nr. 5 (Fig. 20), SEQ. ID. Nr. 10 (Fig. 19) oder einer im wesentlichen gleichen Sequenz und Fragmente, Varianten oder Derivate davon.

Die Erfindung stellt aber noch weitere hTRT-Spezies und Varianten bereit. Ein Beispiel einer hTRT-Variante kann durch ribosomale Leserahmenverschiebung von mRNA, die durch den Clon 712562 (SEQ. ID. Nr. 3 (Fig. 18)) codiert wird resultieren oder durch die pro90 hTRT-Variante, die in SEQ. ID. Nr. 4 (Fig. 20) gezeigt ist und diese resultieren in der Synthese von hTRT-Polypeptiden, die alle TRT-Motive enthalten (siehe als allgemeines Beispiel beispielsweise Tsuchihashi et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87 (1990), 2516; Craigengen et al., Cell 50 (1987), 1; Weiss, Cell 62 (1990), 117). Ribosomale Leserahmenverschiebung kann auftreten, wenn spezifische mRNA-Sequenzen oder Sekundärstrukturen bewirken, dass das Ribosom «verharrt» und innerhalb der Sequenz ein Nucleotid vorwärts oder rückwärts springt. Somit könnte eine ribosomale Leserahmenverschiebung auf der mRNA von 712562 die Synthese eines Polypeptids mit etwa 523 Aminosäureresten bewirken. Eine derartige ribosomale Leserahmenverschiebung auf der Sequenz von pro90 könnte ein Protein mit etwa 1071 Resten ergeben. Es ist offensichtlich, dass die sich aus einer ribosomalen Leserahmenverschiebung ergebenden Proteine auch durch die durch die Erfindung bereitgestellten synthetischen Verfahren oder Rekombinationsverfahren exprimiert werden können.

Menschliche TRT-Proteine, Peptide und funktionell äquivalente Proteine können durch Reinigung, chemische Synthese oder rekombinante Produktion, wie dies ausführlicher nachstehend diskutiert wird, erhalten werden.

## B) TRT-Proteinaktivität

Die erfindungsgemässen TRT-Polypeptide (einschliesslich Fragmente, Varianten, Produkte von alternativen Allelen und Fusionsproteine) können eine, mehrere oder alle der mit nativer hTRT assoziierten funktionellen Aktivitäten aufweisen. Falls nicht anders angegeben, wird hier davon ausgegangen, dass eine hTRT oder ein anderes TRT-Polypeptid eine angegebene Aktivität aufweist, falls sich die Aktivität entweder von dem hTRT-Protein ohne eine assoziierte RNA (z.B. hTR) oder in einem Komplex aus hTRT mit assoziierter RNA (z.B. hTR) zeigt. Die hTR-bindende Aktivität von hTRT ist ein Beispiel für eine mit dem hTRT-Protein assoziierte Aktivität. Verfahren zur Herstellung von Komplexen aus Nucleinsäuren (z.B. hTR) und den erfindungsgemässen hTRT-Polypeptiden werden nachstehend beschrieben.

Die Modifizierung der hTRT-Proteine (z.B. durch chemische oder rekombinante Mittel einschliesslich der Mutation oder Modifikation eines Polynucleotids, das das hTRT-Polynucleotid codiert, oder die chemische Synthese eines Polynucleotids mit einer Sequenz, die sich von der nativen Polynucleotidsequenz unterscheidet) zur Erzielung eines unterschiedlichen Satzes von Aktivitäten im Vergleich zu nativer hTRT kann bei therapeutischen Anwendungen oder ein Screenen nach spezifischen Modulatoren von hTRT oder Telomerase-Aktivität von Nutzen sein. Darüber hinaus können Assays für eine Reihe

von hTERT-Aktivitäten zur Identifizierung von Agenzien (z.B. die Aktivität modulierende Agenzien) von besonderem Nutzen sein, die mit hTERT oder Telomerase zur Veränderung der Telomeraseaktivität interagieren.

Die Aktivitäten von nativer hTERT beinhalten, wie nachstehend diskutiert, katalytische Aktivität von Telomerase (wobei es sich entweder um eine prozessive oder nicht-prozessive Aktivität handeln kann); Telomerase-Prozessivität; Aktivität von konventioneller reversen Transkriptase; nucleolytische Aktivität; Primer- oder Substrat- (Telomer-, synthetisches Telomerase-Substrat- oder Primer-) bindende Aktivität; dNTP-bindende Aktivität; RNA- (d.h. hTR-) bindende Aktivität; und Protein-bindende Aktivität (z.B. Bindung an Telomerase-assoziierte Proteine, Telomer-bindende Proteine oder an einen Komplex aus Protein und telomerer DNA). Natürlich stellt die vorliegende Erfindung auch hTERT-Zusammensetzungen bereit, ohne eine besondere hTERT-Aktivität, jedoch mit nützlichen Aktivitäten, die mit hTERT oder anderen TRT-Proteinen in Bezug stehen (z.B. bestimmte kurze immunogene Peptide, hemmende Peptide).

#### 1) Katalytische Aktivität von Telomerase

Wie hier verwendet, hat ein erfindungsgemässes Polypeptid «katalytische» Aktivität von Telomerase», wenn das Polypeptid in der Lage ist, einen DNA-Primer oder Substrat durch Hinzufügung von einem partiellen, einem oder mehr als einem Repeat mit einer Sequenz (z.B. TTAGGG), die von einer Matrizen-Nucleinsäure (z.B. hTR) codiert wird, zu verlängern. Diese Aktivität kann prozessiv oder nicht-prozessiv sein. Prozessive Aktivität liegt dann vor, wenn eine Telomerase-RNP mehrfach Wiederholungseinheiten an einem Primer oder Telomerase anfügt, bevor die DNA von dem Enzymkomplex freigesetzt wird. Nicht prozessive Aktivität liegt dann vor, wenn Telomerase eine partielle oder eine Wiederholungseinheit an einen Primer anfügt und danach freigesetzt wird. In vivo könnte jedoch eine nicht-prozessive Reaktion mehrfach Wiederholungseinheiten durch aufeinanderfolgende Runden der Assoziation, Verlängerung und Dissoziation anfügen. Dies kann aber auch in vitro vorkommen, wird jedoch typischerweise in Standardassays nicht beobachtet aufgrund des sehr grossen molaren Überschusses an Primern gegenüber Telomerase unter Standard-Assaybedingungen.

Zur Charakterisierung eines hTERT-Polypeptids bezüglich einer nicht-prozessiven Aktivität wird eine übliche Telomerase-Reaktion durchgeführt unter Bedingungen, die eine nicht-prozessive Reaktion begünstigen beispielsweise bei hohen Temperaturen, d.h. 35–40°C, typischerweise 37°C, niedrigen dGTP-Konzentrationen (1 µM oder weniger), hohen Primer-Konzentrationen (5 µM oder mehr), und hohen dATP/TTP-Konzentrationen (2 mM oder mehr), wobei die Temperatur und die dGTP typischerweise die grösste Auswirkung haben. Zur Charakterisierung eines hTERT-Polypeptids bezüglich prozessiver Aktivität wird eine übliche Telomerase-Reaktion durchgeführt unter Verwendung von Bedingungen, die eine prozessive Reaktion begünstigen, beispielsweise 27 bis 34°C, typischerweise 30°C, hohe dGTP-Konzentration (10 µM oder mehr), niedrige Primer-Konzentration (1 µM oder weniger) und/oder niedrige dATP und TTP-Konzentrationen (0,3–1 mM), wobei die Temperatur und die für dGTP typische Konzentration am kritischsten sind. Alternativ können ein TRAP-Assay (für prozessive oder moderat-prozessive Aktivität) oder der Dot-Blot- und Gel-Blot-Assay (für prozessive Aktivität) verwendet werden. Das erfindungsgemässe hTERT-Polypeptid kann eine nicht-prozessive Aktivität, jedoch keine prozessive Aktivität aufweisen (z.B. wenn eine Änderung des hTERT-Polypeptids die Fähigkeit zur Translokation verringert reduziert oder eliminiert), es kann aber auch nur prozessiv sein oder es kann beide Aktivitäten besitzen.

#### a) Nicht-prozessive Aktivität

Eine nicht-prozessive katalytische Aktivität von Telomerase kann den DNA-Primer von der Position, an der das 3'-Ende sich an die RNA-Matrize anlagert, zu dem 5'-Ende der Matrize hin verlängern; diese Verlängerung endet typischerweise mit der Anfügung des ersten G-Rests (z.B. wenn die Matrize hTR ist). Wie in Tabelle 3 gezeigt, hängt die genaue Anzahl der hinzugefügten Nucleotide von der Position des 3'-terminalen Nucleotids des Primers innerhalb der TTAGG-Wiederholungssequenz ab.



TABELLE 3

## NICHT-PROZESSIVE AKTIVITÄT

i) -----TTAGGGttag (DNA)  
 3'-----AUCCCAAUC-----5' (RNA)

ii) -----TTAGgggttag (DNA)  
 3'-----AUCCCAAUC-----5' (RNA)

in DNA, UC = Primer, lc = angefügte Nucleotide

Somit werden an den --TTAGGG-Primer (i) 4 Nucleotide angefügt, während an den --TTAG-Primer (ii) 6 Nucleotide angefügt werden. Die in einer prozessiven Reaktion durch Telomerase angefügte erste Wiederholungseinheit entspricht diesem Schritt; in einer prozessiven Reaktion führt Telomerase jedoch einen Translokationsschritt durch, wobei das 3'-Ende freigesetzt wird und an einer Position, am 3'-Bereich der Matrize, die ausreicht, die Anfügung einer weiteren Wiederholungseinheit zu primen, erneut gebunden wird (siehe Morin, Eur. J. Cancer 33 (1997), 750).

Eine vollständig nicht-prozessive Reaktion führt lediglich zur Produktion einer Bande in einem üblichen Assay unter Verwendung eines einzigen synthetischen Primers. Da dieses Ergebnis auch durch andere Enzyme hervorgerufen werden kann, beispielsweise die Aktivität einer terminalen Transferase, kann es bei einigen Anwendungen wünschenswert sein, zu verifizieren, dass das Produkt das Ergebnis einer katalytischen Aktivität von Telomerase ist. Eine durch Telomerase (hTRT) erzeugte Bande kann durch verschiedene zusätzliche Merkmale unterschieden werden. Die Anzahl an Nucleotiden, die an das Ende des Primers angefügt wird, sollte mit der Position des Primerterminus übereinstimmen. Somit sollte ein --TTAGGG-Primer 4 angefügte Nucleotide aufweisen und ein --TTAG-Primer 6 Nucleotide (siehe vorstehend). In der Praxis können zwei oder mehr in der Sequenz permutierte Primer, die die gleiche Gesamtlänge, jedoch unterschiedliche 5'- und 3'-Endpunkte aufweisen, verwendet werden. Zur Veranschaulichung soll folgendes Beispiel dienen. Die nicht-prozessive Verlängerung des Primers TTAGGGTTAGGGTTAGGG und GTTAGGGTTAGGGTTAGG wird Produkte erzeugen, deren absolute Länge sich in einem Nucleotid unterscheidet (zu TTAGGGTTAGGGTTAGGG werden 4 angefügt zu einer Gesamtlänge von 22 nt und zu GTTAGGGTTAGGGTTAGG werden 5 angefügt zu einer Gesamtlänge von 23 nt). Die Nucleotidabhängigkeit der Reaktion sollte mit der Position des Primerterminus übereinstimmen. Somit sollte ein Produkt des --TTAGGG-Primers dGTP, TTP und dATP, jedoch nicht dCTP benötigen und ein Produkt des --AGGGTT-Primers sollte die dGTP und dATP, jedoch nicht TTP oder dCTP benötigen. Die Aktivität sollte gegenüber der Vorbehandlung mit RNase oder Micrococcus-Nuclease unter Bedingungen, die zum Abbau von hTR und so zur Eliminierung der Matrize führen, empfindlich sein (siehe Morin, Cell 59 (1989) 521).

## b) Prozessive Aktivität

In der Praxis kann eine prozessive Aktivität leicht durch das Auftreten einer Leiter von 6 Nucleotiden in einem üblichen Assay, einem TRAP-Assay, Gel-Blot-Assay oder dem Dot-Blot-Assay leicht beobachtet werden. Der übliche Assay wird in Morin, Cell 59 (1989), 521, auf das hier vollinhaltlich Bezug genommen wird, der TRAP-Assay wird in dem US-Patent Nr. 5 629 154 beschrieben; siehe auch die PCT-Veröffentlichung WO 97/15 687, die PCT-Veröffentlichung WO 95/13 381; Krupp et al., Nucleic Acids Res. 25 (1997), 919 und Wright et al., Nuc. Acids Res. 23 (1995), 3794, auf die hier vollinhaltlich Bezug genommen wird. Der Dot-Blot-Assay ist ausführlich in der parallelen US-Patentanmeldung mit der Serien-Nr. 08/833 377, eingereicht am 4. April 1997, beschrieben, auf die hier vollinhaltlich Bezug genommen wird. Die vorstehend angegebenen Literaturstellen sind hiermit durch die Bezugnahme vollständig und für alle Zwecke mit aufgenommen. Andere Assays bezüglich einer prozessiven katalytischen Aktivität von Telomerase können auch verwendet werden, beispielsweise der "Stretch-PCR"-Assay von Tatematsu et al., Oncogene 13 (1996), 2265. Der Gel-Blot-Assay, eine Kombination von üblichen und Dot-Blot-Assays kann ebenfalls verwendet werden. Bei dieser Variante wird ein üblicher Assay mit einem radioaktiv markierten Nucleotid und mit hohen dGTP-Konzentrationen (z.B. 0,1–2 mM) durchgeführt. Nach Durchführung des üblichen Assays wird die synthetisierte DNA durch denaturierende PAGE aufgetrennt und auf eine Membran (z.B. Nitrocellulose) überführt. Telomer-DNA (das Produkt von Telomerase – ein verlängerter Telomerase-Primer oder Substrat) kann im Anschluss daran durch Ver-

fahren wie Hybridisierung unter Verwendung markierter Telomer-DNA-Sonden (z.B. die CCCTAA-Sequenz enthaltende Sonden, wie sie in dem Dot-Blot-Assay wie vorstehend verwendet werden) nachgewiesen werden. Ein Vorteil dieses Verfahrens ist, dass diese empfindlicher als der übliche Assay sind und Informationen über die Grösse der synthetisierten Fragmente und die Prozessivität der Reaktion liefern.

#### c) Aktivitätsbestimmungen

Die Telomerase-Aktivität eines hTERT-Polypeptids kann unter Verwendung eines ungereinigten, partiell gereinigten oder im wesentlichen gereinigten hTERT-Polypeptids (z.B. in Assoziation mit hTR) in vitro oder nach Expression in vivo bestimmt werden. Beispielsweise kann Telomerase-Aktivität in einer Zelle (z.B. einer Zelle, die ein rekombinantes erfindungsgemässes hTERT-Polypeptid exprimiert) durch Bestimmung der Längenzunahme oder -abnahme der Telomere nachgewiesen werden. Typische Assays bezüglich einer katalytischen Aktivität von Telomerase können unter Verwendung eines Komplexes von hTERT und hTR durchgeführt werden. Es können jedoch alternative Telomerase-Matrizen- RNAs substituiert sein oder man kann Assays zur Bestimmung einer anderen Aktivität wie Telomerase-Primerbindung durchführen. Assays zur Bestimmung der Länge der Telomere sind auf dem Fachgebiet bekannt. Dazu zählen die Hybridisierung von Sonden an Telomer-DNA (ein Amplifikationsschritt kann aufgenommen werden) und eine TRF-Analyse, d.h. die Analyse von Telomer-DNA-Restriktionsfragmenten (TRFs) nach einem Restriktionsendonuclease-Verdau (siehe die PCT-Veröffentlichungen WO 93/235 572 und WO 96/41 016; Counter et al., EMBO J. 11 (1992), 1921; Allsopp et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89 (1992), 10114; Sanno, Am. J. Clin. Pathol. 106 (1996), 16 und Sanno, Neuroendocrinology 65 (1997), 229.

Die katalytische Aktivität von Telomerase eines hTERT-Polypeptids kann durch eine Reihe von Verfahren nachgewiesen werden, wobei die vorstehend beschriebenen Assays und weitere Assays bezüglich einer katalytischen Aktivität von Telomerase verwendet werden können. Bei einem Verfahren wird das hTERT-Protein in einer Telomerase-negativen menschlichen Zelle, in der hTR exprimiert wird (d.h. entweder normalerweise in der Zelle oder durch rekombinante Expression), exprimiert (z.B. wie nachstehend beschrieben) und die Gegenwart oder Abwesenheit von Telomerase-Aktivität wird in der Zelle oder im Zellysat bestimmt. Beispiele für geeignete Telomerase-negative Zellen sind IMR 90 (ATCC, #CCL-186) oder BJ-Zellen (eine menschliche Vorhautfibroblastenlinie; siehe beispielsweise Feng et al., Science 269 (1995), 1236). Zu weiteren Beispielen zählen pigmentierte Retinal-Epithelzellen (RPE), menschliche Nabelschnurarterienepithelzellen (HUVEG; ATCC #CRL-1730), menschliche Aortaendothelzellen (HAEC; Clonetics Corp., #CC-2535) und menschliche Brustepithelzellen (HME; Hammond et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81 (1984), 5435; Stampfer, T., Tissue Culture Methods 9 (1985), 107). In einer alternativen Ausführungsform wird das hTERT-Polypeptid in einer Telomerase-positiven Zelle (z.B. durch Transfektion mit einem hTERT-Expressionsvektor) exprimiert und eine Steigerung der Telomerase-Aktivität in der Zelle im Vergleich zu einer nicht-transfizierten Kontrollzelle wird dann nachgewiesen, wenn das Polypeptid eine katalytische Aktivität von Telomerase aufweist. Üblicherweise ist die katalytische Aktivität von Telomerase in einer mit einem geeigneten Expressionsvektor transfizierten Zelle, die hTERT exprimiert, signifikant erhöht, das heisst sie ist um mindestens etwa das 2fache, mindestens etwa das 5fache oder sogar mindestens etwa das 10fache bis 100fache oder sogar 1000fache höher im Vergleich zu untransfizierten (Kontroll)-Zellen.

In einer weiteren alternativen Ausführungsform wird das hTERT-Protein in einer Zelle (z.B. einer Telomerase-negativen Zelle, in der hTR exprimiert wird, als ein Fusionsprotein (siehe nachstehend) mit einer Markierung oder einem «Epitoptag» zur Erleichterung der Reinigung exprimiert. In einer Ausführungsform wird das RNP aus der Zelle unter Verwendung eines Antikörpers gewonnen, der das «tag» spezifisch erkennt. Bevorzugte «tags» sind typischerweise kurz oder klein und sie können eine Spaltstelle oder andere Eigenschaften aufweisen, die es gestatten, das «tag» von dem hTERT-Polypeptid zu entfernen. Zu den Beispielen von geeigneten «tags» gehören das «Xpres»-Epitop (Invitrogen, Inc. San Diego CA) und weitere Anteile, die von einem Antikörper oder Nucleinsäure spezifisch gebunden werden können. Weitere äquivalente Verfahren sind beispielsweise in Beispiel 6 beschrieben. In einer alternativen Ausführungsform zählen zu den «tags» solche, die von inserierten Sequenzen codiert werden. Beispielsweise von Sequenzen, die in SEQ. ID. Nr. 1 stromaufwärts des ATG-Codons inseriert sind, das die Translation des Proteins von SEQ. ID. Nr. 2 initiiert, wobei die Insertion eines (neuen) Methionin-Initiationscodons in die stromaufwärts gelegene Sequenz mit eingeschlossen sein kann.

Natürlich können bei der Expression einer hTERT-Variante in einer Zelle (beispielsweise als ein Fusionsprotein) und der darauffolgenden Isolation (z.B. als ein Ribonucleoproteinkomplex) andere Zellproteine (d.h. Telomerase-assoziierte Proteine) mit dem isolierten Komplex assoziiert sein (direkt oder indirekt daran gebunden). In solchen Fällen wird es manchmal wünschenswert sein, Telomerase-Aktivität in dem Komplex zu bestimmen, der hTERT, hTR und die assoziierten Proteine enthält.

## 2. Weitere Aktivitäten von Telomerase oder TRT-Protein

Zu den erfindungsgemässen hTRT-Polypeptiden zählen Varianten, denen eine katalytische Aktivität von Telomerase fehlt, die jedoch eine oder mehrere andere Aktivitäten von Telomerase beibehalten haben. Zu diesen anderen Aktivitäten und erfindungsgemässen Verfahren zur Messung solcher Aktivitäten gehören (jedoch ohne Einschränkung darauf) die in den folgenden Abschnitten diskutierten:

### a) Übliche Aktivität bezüglich reverser Transkriptase

Die übliche Telomerase-Aktivität bezüglich reverser Transkriptase wird beispielsweise in Morin (1997), a.a.O., und Spence et al., Science 267 (1995) 988, beschrieben. Da hTRT konservierte Aminosäuremotive enthält, die für die katalytische Aktivität von reverser Transkriptase erforderlich sind, weist hTRT die Fähigkeit auf, exogene (d.h. nicht-hTTR) RNAs zu transkribieren. In einem üblichen RT-Assay wird die Fähigkeit des Enzyms zur Transkription einer RNA-Matrize durch die Verlängerung eines angelagerten DNA-Primers gemessen.

Die Aktivität von reverser Transkriptase kann durch zahlreiche auf dem Fachgebiet bekannte Möglichkeiten bestimmt werden, beispielsweise durch Beobachtung der Zunahme der Grösse eines markierten Nucleinsäureprimers (z.B. RNA oder DNA) oder des Einbaus eines markierten dNTPs. Siehe beispielsweise Ausubel et al., a.a.O.

Da hTRT spezifisch mit hTR assoziiert, kann natürlich der DNA-Primer/RNA-Matrize für ein übliches RT-Assay zur Erzielung von Merkmalen, die mit hTR und einem Telomer-DNA-Primer in Bezug stehen, modifiziert werden. Beispielsweise kann die RNA die Sequenz (CCCTAA)<sub>n</sub> aufweisen, wobei n mindestens 1, mindestens 3, mindestens 10 oder grösser ist. In einer Ausführungsform liegt der (CCCTAA)<sub>n</sub>-Bereich bei oder in der Nähe des 5'-Endes der RNA (ähnlich zu der 5'-Lokalisierung von Matrizenbereichen in Telomerase-RNAs). In ähnlicher Weise kann der DNA-Primer ein 3'-Ende aufweisen, das Anteile der TTAGGG-Telomersequenz aufweist, beispielsweise X<sub>n</sub>TTAG, X<sub>n</sub>AGGG, X<sub>n</sub>(TTAGGG)<sub>q</sub>TTAG, etc., wobei X eine nicht-Telomer-Sequenz ist und n 8–20 oder 60–30 ist und q 1 bis 4 ist. In einer weiteren Ausführungsform weist der DNA-Primer ein 5'-Ende auf, das zu der RNA-Matrize nicht komplementär ist, so dass bei Anlagerung das 5'-Ende ungebunden bleibt. Zusätzliche Modifikationen von Standard-Assays bezüglich reverser Transkription, die bei den erfindungsgemässen Verfahren angewandt werden können, sind auf dem Fachgebiet bekannt.

### b) Nucleolytische Aktivität

Nucleolytische Aktivität von Telomerase wird beispielsweise beschrieben in Morin, 1997, a.a.O. Collins und Grieder, Genes and development 7 (1993) 1364. Telomerase besitzt eine nucleolytische Aktivität (Joyce und Steitz, Trends Biochem. Sci. 12 (1987), 288), jedoch weist die Telomerase-Aktivität besondere Merkmale auf. Telomerase entfernt Nucleotide, üblicherweise nur eines, vom 3'-Ende, wenn das 3'-Ende der DNA an der 5'-Grenze der DNA-Matrize positioniert ist. In Menschen und bei Tetrahymena ist dieses Nucleotid das erste G der Telomer-Wiederholungseinheit (TTAGG im Menschen). Telomerase entfernt bevorzugt G-Reste, weist jedoch keine nucleolytische Aktivität gegenüber anderen Nucleotiden auf. Diese Aktivität kann überwacht werden. Hier werden zur Veranschaulichung zwei unterschiedliche Verfahren beschrieben. Ein Verfahren beinhaltet eine übliche Telomerase-Reaktion mit einem Primer, der die gesamte Matrizensequenz bindet (d.h. an der Matrizenengrenze endet; -TAGGGATTAG im Menschen). Nucleolytische Aktivität wird durch Überwachung des Austauschs des letzten dG-Restes gegen ein in dem Assay zur Verfügung gestelltes radioaktiv markiertes dGTP nachgewiesen. Der Austausch wird durch Auftreten einer Bande mit der Grösse des Ausgangsprimers in der Gelelektrophorese und Autoradiographie überwacht.

In einem bevorzugten Verfahren wird ein DNA-Primer verwendet, der ein «blockiertes» 3'-Ende aufweist, das durch Telomerase nicht verlängert werden kann. Der 3'-blockierte Primer kann in Standard-Telomerase-Assays verwendet werden, er wird jedoch solange nicht verlängert, bis das 3'-Nucleotid durch die nucleolytische Aktivität von Telomerase entfernt wird. Der Vorteil dieses Verfahrens besteht darin, dass Telomerase-Aktivität durch verschiedene Standardmassnahmen überwacht werden kann, und das Signal stark und leichter zu quantifizieren ist. Die Blockierung des 3'-Endes des Primers kann auf verschiedene Weise erreicht werden. In einem Verfahren wird ein 3'-Desoxy-dNTP-Rest an das 3'-Ende des Primers unter Verwendung von Standard-Oligonucleotidsyntheseverfahren angefügt. Dieses Ende weist ein 2'OH auf, jedoch nicht das für Telomerase erforderliche 3'OH. Es gibt noch weitere Möglichkeiten zur Blockierung des 3'-Endes, beispielsweise die Verwendung eines 3'-Dideoxy-Endes eines 3'-Amin-Endes etc. Ein Beispiel für einen Primer für einen Assay bezüglich einer nucleolytischen Aktivität von hTRT ist 5'-TTAGGGTTAGGGTTA (G<sub>3</sub>'), wobei der letzte Rest einem 3'-Desoxy-guanosinrest entspricht (Glen Research, Sterling, VA). Dem Fachmann sind zahlreiche weitere Varianten bezüglich eines kleinen Primers, die auf der hier zur Verfügung gestellten Lehre basieren, bekannt.

## c) Primer (Telomer)-Bindungsaktivität

Primer (Telomer)-Bindungsaktivität von Telomerase wird beispielsweise von Morin, 1997, a.a.O.; Collins et al., Cell 81 (1995), 667 und Harrington et al., J. Biol. Chem. 270 (1995), 8893 beschrieben. Man nimmt an, dass Telomerase zwei Stellen aufweist, die einen Telomer-DNA-Primer binden. Die mit der Primerbindung assoziierten RT-Motive zeigen, dass hTRT und/oder hTRT/hTR DNA-Primer-Bindungsaktivität aufweist. Es gibt verschiedene Möglichkeiten, Primer-Bindungsaktivität zu bestimmen. Allerdings haben die meisten Verfahren einen Schritt gemeinsam, nämlich die Inkubation eines markierten DNA-Primers mit hTRT oder hTRT/hTR oder anderen TRT/TR-Kombinationen unter geeigneten Bindungsbedingungen. Die meisten Verfahren verwenden auch ein Mittel zur Abtrennung ungebundener DNA von Protein-gebundener DNA. Diese Verfahren beinhalten folgende Schritte:

i) Gel-«shift»-Assays (die auch als «electrophoretic/mobility shift»-Assays bezeichnet werden) sind Assays, bei denen ungebundener DNA-Primer von Protein-gebundenem DNA-Primer durch Elektrophorese in einem nicht-denaturierenden Gel abgetrennt wird (Ausubel et al., a.a.O.).

ii) Matrixbindungs-Assays beinhalten verschiedene Variationen hinsichtlich des Grundverfahrens. Dazu gehören die Bindung der hTRT oder des hTRT/hTR-Komplexes an eine Matrix (z.B. Nitrocellulose) entweder vor oder nach Inkubation mit dem markierten Primer. Durch die Bindung der hTRT an eine Matrix kann der ungebundene Primer von dem gebundenen Primer mechanisch abgetrennt werden. Restliche ungebundene DNA kann durch Waschen der Membran vor der Quantifizierung entfernt werden. Es ist für den Fachmann offensichtlich, dass es verschiedene Möglichkeiten zur Kopplung von Proteinen an solche Matrices, feste Träger und Membranen gibt, dazu gehören beispielsweise chemische, photochemische und UV-Quervernetzung, Antikörper/Epitop und nicht-kovalente, hydrophobe, (elektrostatische etc.) Interaktionen.

Als DNA-Primer kann jede DNA mit einer Affinität für Telomerase verwendet werden, beispielsweise ein Telomer-DNA-Primer, wie  $(TTAGGG)_n$ , wobei  $n$  1 bis 10 sein kann und typischerweise 3 bis 5 ist. Die 3'- und 5'-Enden können an jeder Position der Wiederholungssequenz enden. Die Primer können auch 5'- oder 3'-Verlängerungen von Nicht-Telomer-DNA aufweisen, die eine Markierung oder einen Nachweis erleichtern können. Die Primer können auch derivatisiert sein, um beispielsweise den Nachweis oder die Isolierung zu erleichtern.

## d) dNTP-Bindungsaktivität

dNTP-Bindungsaktivität von Telomerase wird beispielsweise in Morin, 1997, a.a.O., und Spence et al., a.a.O. beschrieben. Telomerase benötigt für die Synthese von DNA dNTPs. Das hTRT-Protein weist eine Nucleotid-Bindungsaktivität auf und es kann hinsichtlich einer dNTP-Bindung ähnlich wie andere Nucleotid-bindende Proteine untersucht werden (Kantrowitz et al., Trends Biochem. Sci. 5 (1980), 124). Typischerweise wird die Bindung eines markierten dNTPs oder eines dNTP-Analogs überwacht, so wie dies auf dem Fachgebiet für Nicht-Telomerase-RT-Proteine bekannt ist.

## e) RNA (d.h. hTR)-Bindungsaktivität

RNA (d.h. hTR)-Bindungsaktivität von Telomerase wird beispielsweise in Morin, 1997, a.a.O., beschrieben, Harrington et al., Science 275 (1997), 973 und Collins et al., Cell 81 (1995), 677. Die RNA-Bindungsaktivität eines erfindungsgemässen TRT-Proteins kann auf ähnliche Weise wie dies vorstehend bezüglich des DNA-Primer-Bindungsassays beschrieben wurde, unter Verwendung einer markierten RNA-Sonde nachgewiesen werden. Verfahren zur Abtrennung gebundener und nicht-gebundener RNA und zum Nachweis von RNA sind auf dem Fachgebiet gut bekannt. Diese können für die erfindungsgemässen Aktivitätsassays auf ähnliche Weise wie dies für den DNA-Primer-Bindungsassay beschrieben wurde, angewandt werden. Bei der RNA kann es sich um hTR mit vollständiger Länge handeln, Fragmente von hTR oder andere RNAs, für die gezeigt werden kann, dass sie eine Affinität für Telomerase oder hTRT aufweisen. Siehe US-Patent Nr. 5 583 016 und PCT-Veröffentlichung Nr. 96/40 868 (siehe auch USSN 08/478 352, eingereicht am 7. Juni 1995).

## 3) Telomerase-Motive als Ziele

Wie bereits vorstehend angemerkt, stellt die vorliegende Erfindung hTRT-Polypeptide bereit, die nicht den vollen Satz (wie vorstehend beschrieben) an Telomerase-Aktivitäten von natürlich vorkommender Telomerase, hTRT oder anderen TRTProteinen aufweisen. Es ist angesichts der hier vorliegenden Beschreibung von RT und von Telomerase-spezifischen Motiven von TRT offensichtlich, dass Änderungen oder Mutationen von konservierten Aminosäureresten, die in den oben diskutierten Motivsequenzen gefunden werden können, zur Entstehung von Mutanten mit Aktivitätsverlusten führen, die für therapeutische Zwecke, zum Screenen und zur Charakterisierung von Arzneimitteln und für weitere Anwendungsmöglichkeiten von Nutzen sind. Beispielsweise führt die Deletion der Motive B in den RT-Domänen des endogenen TRT-Gens in *S. pombe*, wie in Beispiel 1 beschrieben, zu haploiden Zellen, in denen eine progressive Telomerverkürzung bis zu dem Punkt, an dem eine Hybridisierung mit Telomer-Wiederho-

lungseinheit fast nicht mehr nachweisbar war, beobachtet werden konnte, was einen Verlust einer katalytischen Aktivität von Telomerase anzeigt. Auf ähnliche Weise können Änderungen in der WxGxS-Stelle von Motiv E die DNA-Primerbindung oder Funktion von Telomerase beeinflussen. Darüber hinaus können Änderungen der Aminosäuren in den Motiven A, B' und C die katalytische Aktivität von Telomerase beeinflussen. Die Mutation des DDMotivs von hTRT kann Telomerase-Aktivität erheblich verringern oder aufheben (siehe Beispiel 16).

#### C) Die Synthese von hTRT und anderen TRT-Polypeptiden

Die Erfindung stellt eine Reihe von Verfahren zur Herstellung der hier offenbarten hTRT und anderer TRT-Polypeptide bereit. In den folgenden Abschnitten wird die chemische Synthese und die rekombinante Expression von hTRT-Proteinen, einschliesslich Fusionsproteinen ausführlich beschrieben.

##### 1) Chemische Synthese

Die Erfindung stellt hTRT-Polypeptide bereit, die ganz oder teilweise unter Verwendung von allgemeinen, auf dem Fachgebiet gut bekannten chemischen Verfahren synthetisiert wurden (siehe beispielsweise Caruthers et al., *Nucleic Acids Res. Symp. Ser.* (1980) 215–223 und Horn et al., *Nucleic Acids Res. Symp. Ser.* (1980), 225–232). Beispielsweise kann eine Peptidsynthese unter Verwendung verschiedener Festphasenverfahren durchgeführt werden (Roberge et al., *Science* 269 (1995) 202), darunter fällt auch die automatische Synthese (z.B. unter Verwendung des Peptid Synthesizers ABI 431A von Perkin Elmer gemäss den Anweisungen des Herstellers). Wenn ein Protein mit vollständiger Länge erwünscht ist, können kürzere Polypeptide durch Kondensation des Aminoterminus eines Moleküls mit dem Carboxylterminus des anderen Moleküls zur Bildung einer Peptidbindung fusioniert werden.

Die neu synthetisierten Peptide können wesentlich gereinigt werden, beispielsweise durch präparative HPLC (siehe beispielsweise Creighton *Proteins, Structures and Molecular Principles*, WH Freeman and Co., New York NY (1983). Die Zusammensetzung der synthetischen Peptide (oder beliebiger anderer erfindungsgemässer Peptide oder Polypeptide) kann durch Aminosäureanalyse oder Sequenzierung (z.B. das Verfahren des Edman-Abbaus; Creighton, a.a.O.) bestätigt werden. Es ist wichtig anzumerken, dass die Aminosäuresequenz von hTRT oder einem beliebigen Teil davon während der Synthese verändert werden kann und/oder unter Verwendung chemischer Verfahren mit Sequenzen von anderen Proteinen kombiniert werden kann. Dies kann auch anderweitig durchgeführt werden und einen beliebigen Teil der Aminosäuresequenzen für jeden beliebigen Zweck zur Herstellung einer Variante der erfindungsgemässen Polypeptide umfassen.

##### 2) Rekombinante Expression von hTRT und anderen Trtproteinen

Die vorliegende Erfindung stellt Verfahren, Reagenzien, Vektoren und Zellen bereit, die zur Expression von hTRT-Polypeptiden und Nucleinsäuren von Nutzen sind, wobei in vitro (zellfrei), ex vivo oder in vivo (auf Zellen oder Organismen basierende) rekombinante Expressionssysteme verwendet werden. In einer Ausführungsform umfasst die Expression des hTRT-Proteins oder eines Fragments davon die Insertion der codierenden Sequenz in einen geeigneten Expressionsvektor (d.h. ein Vektor, der die erforderlichen Elemente für die Transkription und Translation der inserierten codierenden Sequenz enthält). Somit betrifft ein Aspekt der Erfindung die Bereitstellung eines Polynucleotids, das in der Sequenz im wesentlichen identisch ist zu einer ein hTRT-Gen codierenden Sequenz von mindestens 25 Nucleotiden und vorzugsweise für viele Anwendungsmöglichkeiten 50 bis 100 Nucleotiden oder mehr der erfindungsgemässen hTRT-cDNAs oder Gene, das zur Bildung einer Transkriptionseinheit, die ein hTRT-Polypeptid exprimieren kann, mit einem Promotor funktionell verknüpft ist. Zur Konstruktion der Expressionsvektoren, die eine durch die vorliegende Erfindung bereitgestellte hTRTSequenz und geeignete Transkriptionskontrollen oder Translationskontrollen enthalten, können dem Fachmann gut bekannte Verfahren angewandt werden (siehe beispielsweise Sambrook et al., a.a.O., Ausubel et al., a.a.O. und die vorliegende Beschreibung).

Zu den erfindungsgemässen hTRT-Polypeptiden zählen Fusionsproteine, die hTRT-Polypeptide oder Fragmente des hTRTProteins enthalten. Die Fusionsproteine werden typischerweise rekombinant hergestellt, sie können jedoch auch chemisch synthetisiert werden. Fusionsproteine können zur Erzielung einer erhöhten Expression der hTRT-Polypeptidkonstrukte von Nutzen sein oder zur Herstellung von hTRT-Polypeptiden mit anderen gewünschten Eigenschaften beispielsweise eine Markierung umfassen (z.B. eine enzymatische Reportergruppe), eine bindende Gruppe oder ein Antikörper-Epitop umfassen. Ein Beispiel für ein Fusionsprotein, das hTRT und «enhanced green fluorescent protein» (EGFP)-Sequenzen umfasst, ist nachstehend in Beispiel 15 beschrieben. Es ist für den Fachmann offensichtlich, dass die in Beispiel 15 und an anderen Stellen hier diskutierten Verwendungen und Anwendungsmöglichkeiten nicht auf die spezifischen Fusionsproteine beschränkt sind, sondern die Verwendungsmöglichkeiten für die verschiedenen Fusionskonstrukte veranschaulichen sollen.

Die erfindungsgemässen Fusionsproteinsysteme können auch zur Erleichterung der effizienten Herstellung und Isolierung von hTRT-Proteinen oder Peptiden verwendet werden. Beispielsweise umfasst in

einigen Ausführungsformen der Nicht-hTRT-Sequenzanteil des Fusionsproteins ein kurzes Peptid, das an ein immobilisiertes Molekül spezifisch gebunden werden kann, so dass das Fusionsprotein von nicht-gebundenen Bestandteilen (wie nicht verwandte Proteine in einem Zellysatz) abgetrennt werden kann. Ein Beispiel dafür ist eine Peptidsequenz, die von einem spezifischen Antikörper gebunden wurde. Ein weiteres Beispiel ist ein Peptid, das Polyhistidin-Spuren umfasst, beispielsweise (His)<sub>6</sub> oder Histidin-Tryptophan-Sequenzen, die durch ein Harz gebunden werden können, das Nickel- oder Kupferionen enthält (d.h. Metallchelate-Affinitätschromatographie). Zu weiteren Beispielen zählen Protein A-Domänen oder Fragmente, die die Reinigung auf immobilisierten Immunglobulin erlauben, und die in dem «FLAGS»-Verlängerungs-/Affinitäts-Reinigungssystem verwendete Domäne (Immunex Corp., Seattle WA). In einigen Ausführungsformen enthält das Fusionsprotein eine Spaltstelle, so dass die hTRT-Sequenz oder eine andere TRT-Polypeptidsequenz von der Nicht-hTRT-Peptidsequenz oder Nicht-hTRT-Proteinsequenz leicht abgetrennt werden kann. In diesem Fall kann die Spaltung chemisch erfolgen (z.B. mit Bromcyan, 2-(2-Nitrophenylsulfonyl)-3-methyl-3'-bromindolen, Hydroxylamin oder niedriger pH-Wert) oder enzymatisch (z.B. mit Faktor Xa, Enterokinase). Die Auswahl des Fusions- und Spaltsystems kann teilweise von dem Anteil (d.h. der Sequenz) des zu exprimierenden hTRT-Polypeptids abhängen. Fusionsproteine sind allgemein beschrieben in Ausubel et al., a.a.O., Kapitel 16, Kroll et al., DNA Cell Biol. 12 (1993), 441 und in dem Invitrogen-Katalog von 1997 (Invitrogen Inc., San Diego CA). Weitere Beispiele für erfindungsgemässe Fusionsproteine mit Epitop-«tags» oder «tags» und Spaltstellen werden nachstehend in Beispiel 6 bereitgestellt.

Es ist für den Fachmann offensichtlich, dass sich die in diesem Abschnitt diskutierten Expressionssysteme zwar auf die Expression von hTRT-Polypeptiden konzentrieren, jedoch die gleichen oder ähnliche Zellen, Vektoren und Verfahren zur Expression von erfindungsgemässen hTRT-Polypeptiden verwendet werden können, dazu gehören auch «sense»- und «antisense»-Polynucleotide, wobei die Herstellung von hTRT-Polypeptiden nicht notwendigerweise erwünscht ist. Typischerweise erfordert die Expression eines Polypeptids ein geeignetes Initiationscodon (z.B. Methionin), einen offenen Leserahmen und Translationsregulationssignale (z.B. eine Ribosomenbindungsstelle, ein Terminationscodon), die fehlen können, wenn die Translation einer Nucleinsäuresequenz zur Herstellung eines Proteins nicht erwünscht ist.

Die Expression von hTRT-Polypeptiden und Polynucleotiden kann durchgeführt werden, um die Vorteile zu nutzen, die mit den der vorliegenden Erfindung bereitgestellten Vorteilen einhergehen. Ein Beispiel eines solchen Vorteils ist die Expression von hTRT-Polypeptiden, die im Anschluss daran von der Zelle, in der sie exprimiert wurden, isoliert werden (z.B. zur Herstellung grosser Mengen von hTRT zur Verwendung als ein Vakzin). Ein zweites Beispiel für einen solchen Vorteil ist die Expression von hTRT in einer Zelle zur Veränderung des Phänotyps der Zelle (wie bei Anwendungen in der Gentherapie). Nicht-Säugerzellen können für die Expression von hTRT zur Reinigung verwendet werden, während eukaryotische Zellen, insbesondere Säugerzellen (z.B. menschliche Zellen) nicht nur für die Isolation und Reinigung von hTRT verwendet werden können, sondern auch zur Expression von hTRT, wenn eine Veränderung im Phänotyp in einer Zelle erwünscht ist (z.B. um eine Änderung in der Fähigkeit zur Proliferation z.B. bei Anwendungen in der Gentherapie zu erreichen). hTRT-Polypeptide mit einer oder mehreren Telomerase-Aktivitäten (z.B. der katalytischen Aktivität von Telomerase) können beispielsweise, allerdings ohne Beschränkung darauf, in einer Wirtszelle exprimiert werden, um so die Fähigkeit einer Zelle zur Proliferation zu erhöhen (z.B. um eine Zelle zu immortalisieren). Im Gegensatz dazu können hTRT-«antisense»-Polynucleotide oder hemmende Polypeptide typischerweise zur Herabsetzung der Fähigkeit einer Zelle zur Proliferation exprimiert werden (z.B. bei einer Telomerase-positiven malignen Tumorzelle). Zahlreiche spezifische Anwendungsmöglichkeiten werden hier beschrieben, beispielsweise bei der nachstehenden Diskussion der Verwendungen der erfindungsgemässen Reagenzien und Verfahren für therapeutische Anwendungen.

Zu den Beispielen von nützlichen erfindungsgemässen Expressionssystemen (Zellen, regulatorische Elemente, Vektoren und Expression) gehören eine Reihe von zell-freien Systemen, wie beispielsweise ein Retikulocytenlysatz und Weizenkeim-Systeme, die hTRT-Polynucleotide gemäss allgemeiner, auf dem Fachgebiet gut bekannter Verfahren verwenden (siehe beispielsweise Ausubel et al., a.a.O., Kapitel 10). In alternativen Ausführungsformen stellt die Erfindung Reagenzien und Verfahren zur Expression von hTRT in prokaryotischen oder eukaryotischen Zellen bereit. Die vorliegende Erfindung stellt somit Nucleinsäuren bereit, die hTRT-Polynucleotide codieren, Proteine, Protein-Untersequenzen oder Fusionsproteine, die in Bakterien, Pilzen, Pflanzen, Insekten und Tieren, einschliesslich Menschen, auf dem Fachgebiet bekannten Zellexpressionssystemen einschliesslich isolierter Zellen, Zelllinien, Zellkulturen, Geweben und ganzen Organismen exprimiert werden können. Es ist für den Fachmann offensichtlich, dass die in eine Wirtszelle oder ein zellfreies Expressionssystem eingeführten hTRT-Polynucleotide üblicherweise mit einer geeigneten Expressionskontrollsequenz für jeden Wirt oder jedes zellfreie System funktionell verknüpft sind.

Zu den nützlichen bakteriellen Expressionssystemen gehören *E. coli*, Bacilli (wie beispielsweise *Bacillus subtilis*), andere Enterobacteriaceae (wie *Salmonella*, *Serratia* und zahlreiche *Pseudomonas*-Arten) oder andere bakterielle Wirte (z.B. *Streptococcus cremoris*, *Streptococcus lactis*, *Streptococcus thermophilus*, *Leuconostoc citrovorum*, *Leuconostoc mesenteroides*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus lactis*, *Bifidobacterium bifidum*, *Bifidobacterium breve* und *Bifidobacterium longum*). Zu den in Prokaryo-

ten nützlich n hTRT-Expressionskonstrukten gehören rekombinante Bakteriophagen, Plasmid- oder Cosmid-DNA-Expressionsvektoren oder ähnliche und diese beinhalten typischerweise Promotorsequenzen. Zu den Beispielen für Promotoren zählen induzierbare Promotoren, wie der lac-Promotor, der Hybrid-lacZ-Promotor des «Bluescript7»-Phagemids (Stratagene, La Jolla CA) oder pSport1 (Gibco BRL); Promotorsysteme vom Phagen lambda; ein Tryptophan (trp)-Promotorsystem; ptp-lac-Hybride etc. Die bakteriellen Expressionskonstrukte enthalten gegebenenfalls eine Ribosomenbindungsstelle und regulatorisch Signalsequenzen für die Termination der Transkription. Zu den veranschaulichenden Beispielen von spezifischen Vektoren, die für die Expression von Nutzen sind, zählen pTrcHis2 (Invitrogen, San Diego CA), pThioHis A, B & C und zahlreiche andere auf dem Fachgebiet bekannte Vektoren oder solche, die entwickelt werden können (siehe beispielsweise Ausubel, a.a.O.). Zu den für Bakterien nützlichen Vektoren gehören solche, die die Herstellung von hTRT-Fusionsproteinen erleichtern. Zu den für die Expression von Fusionsproteinen in bakteriellen Zellen mit hohem Niveau nützlichen Vektoren zählen, allerdings ohne Beschränkung darauf, die multifunktionalen Clonierungs- und Expressionsvektoren für *E. coli*, beispielsweise der vorstehend erwähnte Bluescript7 (Stratagene), bei dem die ein hTRT-Protein, ein hTRT-Fusionsprotein oder ein hTRT-Fragment codierende Sequenz im Leserahmen mit Sequenzen für das aminoterminale Met und die sich daran anschliessenden 7 Reste der  $\beta$ -Galactosidase in den Vektor ligiert werden kann, so dass ein Hybridprotein hergestellt wird (z.B. pIN-Vektoren; van Heeke und Schuster, J. Biol. Chem. 264 (1989), 5503). Vektoren, wie beispielsweise pGEX-Vektoren (z.B. pGEX-2TK; Pharmacia Biotech) können auch zur Expression von Fremdpolypeptiden wie einem hTRT-Protein als Fusionsproteine mit Glutathion-S-Transferase (GST) verwendet werden. Solche Fusionsproteine können von lysierten Zellen durch Adsorption an Glutathion-Agarose-Kügelchen und anschliessender Elution in Gegenwart von freiem Glutathion gereinigt werden. In solchen Systemen hergestellte Proteine enthalten oft Protease-Spaltstellen für Enterokinase, Thrombin oder Faktor Xa, so dass das erwünschte clonierte Polypeptid von der GST-Einheit, falls erwünscht, freigesetzt werden kann, was bei der Reinigung oder anderen Anwendungsmöglichkeiten von Nutzen ist. Weitere Beispiele sind Fusionsproteine, die hTRT und das Maltose-bindende Protein von *E. coli* (MBP) oder Thioredoxin von *E. coli* umfassen: Veranschaulichende Beispiele von in bakteriellen Zellen nützlichen hTRT-Expressionskonstrukten werden in dem nachstehenden Beispiel 6 bereitgestellt.

Die vorliegende Erfindung stellt ferner hTRT-Polypeptide zur Verfügung, die in Pilzsystemen wie beispielsweise *Dictyostelium* und vorzugsweise Hefe wie beispielsweise *Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia pastoris*, *Torulopsis holmii*, *Saccharomyces fragilis*, *Saccharomyces lactis*, *Hansenula polymorpha* und *Candida pseudotropicalis* exprimiert wurden. Für die Expression von hTRT in Hefe stehen eine Reihe von geeigneten Vektoren zur Verfügung, zu denen Plasmid- und YACs-Vektoren gehören (YACs = künstliche Hefechromosomen). Die Vektoren enthalten typischerweise Expressionskontrollsequenzen, wie z.B. konstitutive oder induzierbare Promotoren (z.B. den  $\alpha$ -Faktor, Alkoholoxidase, PGH und 3-Phosphoglyceratkinase oder andere glykolytische Enzyme), einen Replikationsursprung, Terminationssequenzen etc., je nachdem, was erwünscht ist. Zu den zur Verwendung in *Pichia* geeigneten Vektoren gehören pPICZ, His6/pPICZB, pPICZalpha, pPIC3.5K, pPIC9K, pA0815, pGAP2A, B & C, pGAP2alpha A, B und C (Invitrogen, San Diego, CA) und zahlreiche weitere auf dem Fachgebiet bekannte oder noch zu entwickelnde Vektoren. In einer Ausführungsform wird der Vektor His6/pPICZB (Invitrogen, San Diego, CA) zur Expression eines His<sub>6</sub>-hTRT-Fusionsproteins in der Hefe *Pichia pastoris* verwendet. pYES2 (Invitrogen, San Diego, CA) ist ein Beispiel für einen in *Saccharomyces* nützlichen Vektor. Veranschaulichende Beispiele von in Hefe nützlichen hTRT-Expressionskonstrukten werden in dem nachstehenden Beispiel 6 bereitgestellt.

Die erfindungsgemässen hTRT-Polypeptide können auch in Pflanzenzellensystemen exprimiert werden, die mit Pflanzen- oder Pflanzenvirus-Expressionsvektoren (z.B. mit Blumenkohlmosaikvirus, CaMV; Tabakmosaikvirus, TMV) transfiziert oder mit bakteriellen Expressionsvektoren (Ti oder dem Plasmid pBR322) transformiert wurden. In Fällen, bei denen Pflanzenvirus-Expressionsvektoren verwendet werden, kann die Expression einer hTRT-codierenden Sequenz durch eine Reihe von Promotoren gesteuert werden. Beispielsweise können virale Promotoren wie die 35S und 19S-Promotoren von CaMV (Brisson et al. Nature 310 (1984) 511–514) allein oder in Kombination mit der Omega Leader-Sequenz von TMV verwendet werden (Takamatsu et al., EMBO J. 6 (1987) 307–311). In einer alternativen Ausführungsform können Pflanzenpromotoren wie der Promotor von dem Gen für die kleine Untereinheit von RUBISCO (Coruzzi et al., EMBO J. 3 (1984) 1671 bis 1680 und Broglie et al., Science 224 (1984), 838–843) oder Hitzeschockpromotoren (Winter und Sinibaldi, Results Probl. Cell Differ. 17 (1991), 85) oder Promotoren von Genen für Speicherproteine verwendet werden. Diese Konstrukte können durch direkte DNA-Transformation oder pathogen-vermittelte Transfektion in Pflanzenzellen eingeführt werden (zum weiteren Studium dieser Verfahren sei verwiesen auf Hobbs oder Murry (1992) in McGraw Hill Yearbook of Science and Technology, McGraw Hill New York NY, S. 191–196 (1992), oder Weissbach und Weissbach (1988), Methods for Plant Molecular Biology, Academic Press, New York NY, S. 421–463).

Ein weiteres, durch die vorliegende Erfindung bereitgestelltes Expressionssystem zur Expression eines hTRT-Proteins ist ein Insektensystem. Bei einem bevorzugten System wird ein Baculovirus-Polyhedrin-Promotor verwendet. In einem dieser Systeme wird der nucleäre Polyhedrosis-Virus von *Autographa californica* (AcNPV) als Vektor zur Expression von Fremdgenen in *Spodoptera frugiperda*-Zellen oder in *Trichoplusia*-Larven verwendet. Die das gewünschte Gen codierende Sequenz kann in einen



nicht-essentiellen Bereich des Virus, beispielsweise das Polyhedringen, cloniert werden und unter die Kontrolle des Polyhedrinpromotors gestellt werden. Die erfolgreiche Insertion der Sequenz, die beispielsweise das hTERT-Protein codiert, führt zur Inaktivierung des Polyhedringens und es wird ein rekombinantes Virus hergestellt, dem das Hüllprotein fehlt. Die rekombinanten Viren werden dann zur Infektion von *S. frugiperda*-Zellen oder *Trichoplusia*-Larven verwendet, in denen dann die hTERT-Sequenz exprimiert wird (siehe bezüglich allgemeiner Verfahren Smith et al., *J. Virol.* 46 (1983), 584 und Engelhard et al., *Proc. Natl. Acad. Sci.* 91 (1994) 3224-7). Zu den für die Baculovirus-Expression nützlichen Vektoren zählen pBlueBacHis2 A, B & C; pBlueBac4.5; pMelBacB und zahlreiche andere auf dem Fachgebiet bekannte Vektoren oder noch zu entwickelnde Vektoren. Veranschaulichende Beispiele von hTERT-Expressions-Konstrukten, die in Insektenzellen von Nutzen sind, werden in dem nachstehenden Beispiel 6 bereitgestellt.

Die vorliegende Erfindung stellt auch Expressionssysteme in Säugern und Säugerzellen bereit. Wie bereits vorstehend angemerkt, können hTERT-Polynucleotide in Säugerzellen (z.B. menschlichen Zellen) für die Herstellung von signifikanten Mengen von hTERT-Polypeptiden (z.B. zur Reinigung) oder zur Veränderung des Phänotyps einer Zielzelle (z.B. für Zwecke der Gentherapie, Zellimmortalisation etc.) exprimiert werden. Im letzteren Fall kann das exprimierte hTERT-Polynucleotid ein Polypeptid mit einer katalytischen Aktivität von Telomerase codieren oder auch nicht. Das heisst, es kann ein «sense»- oder «antisense»-Polynucleotid, ein hemmendes oder stimulierendes Polypeptid, ein Polypeptid mit null, einer oder mehreren Telomerase-Aktivitäten exprimiert werden. Weitere Kombinationen und Varianten sind für den Fachmann nach Lesen dieser Beschreibung offensichtlich.

Zu den für die Expression der erfindungsgemässen Nucleinsäuren geeigneten Gewebekultur-Säugerzellen gehören jede normale sterbliche, normale oder abnorme unsterbliche tierische oder menschliche Zelle. Dazu gehören: die mit SV40 transformierte Affennierenlinie CV1 (COS-7, ATCC CRL 1651), die menschliche embryonale Nierenlinie (293) (Graham et al., *J. Gen. Virol.* 36 (1977), 59), die Babyhamster-nierenzellen (BHK, ATCC CCL 10), CHO (ATCC CCL 61 und CRL 9618), Maus-Sertolizellen (TM4, Mather, *Biol. Reprod.* 23 (1980) 243-251), Affennierenzellen (CV1, ATCC CCL 70), Nierenzellen der Afrikanischen Grünen Meerkatze (VERO-76, ATCC CRL 1587), menschliche Cervix-Karzinomzellen (HeLa, ATCC CCL 2), Hundenierenzellen (MDCK, ATCC CCL 34), Büffelrattenleberzellen (BRL 3A, ATCC CRL 1442), menschliche Lungenzellen (W138, ATCC CCL 75), menschliche Leberzellen (HEP G2, HB 8065), Maus-Brusttumor (MMT 060562, ATCC CCL 51) und TRI-Zellen (Mather et al., *Annals N.Y. Acad. Sci.* 383 (1982), 44-46, MDCK (ATCC CCL 34 und CRL 6253), HEK 293 (ATCC CRL 1573), WI-38 (ATCC CCL 75) (ATCC: American Type Culture Collection Rockville, MD)). Die Verwendung von Säuger-Gewebezellkulturen zur Expression von Polypeptiden wird allgemein in Winnacker, *FROM GENES TO CLONES* (VCH-Verlag, N.Y., N.Y., 1987) erläutert.

Für Säugerwirtszellen werden auf Viren basierende und nichtvirale Expressionssysteme bereitgestellt. Zu den nicht-viralen Vektoren und Systemen gehören Plasmide, episomale Vektoren, typischerweise mit einer Expressionskassette für Expression eines Proteins oder einer RNA, und menschliche künstliche Chromosomen (siehe z.B. Harrington et al., *Nat Genet* 15 (1997), 345). Zu den für die Expression von hTERT-Polynucleotiden und Polypeptiden in Säugerzellen (z.B. menschlichen Zellen) nützlichen nicht-viralen Vektoren gehören pcDNA3.1/His, pEBVHis A, B & C (Invitrogen, San Diego CA), MPSV-Vektoren, andere in dem Invitrogen-Katalog von 1997 beschriebene Vektoren (Invitrogen Inc., San Diego CA), der aufgrund der Bezugnahme vollständig zum Offenbarungsgehalt der vorliegenden Beschreibung zählt, sowie bezüglich weiterer Proteine zahlreiche andere auf dem Fachgebiet bekannte Vektoren und Systeme. Veranschaulichende Beispiele von in Säugerzellen nützlichen hTERT-Expressionskonstrukten werden nachstehend in Beispiel 6 bereitgestellt.

Zu den nützlichen viralen Vektoren zählen Vektoren, die auf Retroviren basieren, Adenoviren, adeno-assoziierte Viren, Herpesviren, auf SV40 basierende Vektoren, Papilloma Viren, HBP-Epstein Barr Virus, Vaccinia Virus-Vektoren und «Semliki Forest»-Virus (SFV). SFV und Vacciniavektoren werden allgemein in Ausubel et al., a.a.O., Kapitel 16 diskutiert. Diese Vektoren sind oft aus zwei Komponenten aufgebaut, einem modifizierten viralen Genom und einer dieses umgebenden Hüll-Struktur (siehe allgemein Smith, *Annu. Rev. Microbiol.* 49 (1995), 807). Allerdings werden gelegentlich virale Vektoren in nackter Form oder umhüllt mit Proteinen, die nicht zu viralen Proteinen zählen, eingeführt. Die virale Nucleinsäure in einem Vektor kann jedoch auf vielfältige Weise verändert werden, beispielsweise wenn dies für die Gentherapie erwünscht ist. Ziele dieser Veränderungen sind das Wachstum des Virus in Zielzellen zu verhindern und Beibehaltung seiner Fähigkeit in Vektorform in verfügbaren Pack- oder Helferzellen zu wachsen, um Raum innerhalb des viralen Genoms zur Insertion von exogenen DNA-Sequenzen bereitzustellen und um neue Sequenzen einzufügen, die das gewünschte Gen codieren und eine geeignete Expression ermöglichen. Somit umfassen Vektor-Nucleinsäuren im allgemeinen zwei Bestandteile: essentielle in cis wirkende Viralsequenzen zur Replikation und Verpackung in einer Helferlinie und die Transkriptionseinheit für das exogene Gen. Andere virale Funktionen werden in einer spezifischen Verpackungs- oder Helfer-Zelllinie in trans exprimiert. Adenovirus-Vektoren (z.B. zur Verwendung in der Gentherapie bei Menschen) sind beispielsweise in Rosenfeld et al., *Cell* 68 (1992), 143 und in den PCT-Veröffentlichungen Wo 94/12 650; 94/12 649 und 94/12 629 beschrieben. In Fällen, in denen als Expressionsvektor ein Adenovirus verwendet wird, kann eine hTERT codierende Sequenz in einen Adenovirus-Transkriptions/Translations-Komplex ligiert werden, der aus dem späten Promotor und der drei-



teiligen Leadersequenz besteht. Die Insertion in einen nicht-essentiellen E1- oder E3-Bereich des viralen Genoms ergibt ein lebensfähiges Virus, das in infizierten Wirtszellen exprimieren kann (Logan und Shenk, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 81 (1984), 3655). Replikations-defiziente retrovirale Vektoren, die eine therapeutische Polynucleotidsequenz als Teil des retroviralen Genoms enthalten, werden beispielsweise beschrieben in Miller et al., *Mol. Cell. Biol.* 10 (1990) 4239; Kolberg, *J. NIH Res.* 4 (1992), 43 und Cornette et al., *Hum. Gene Ther.* 2 (1991), 215.

In Säuger-Zellsystemen sind oft Promotoren von Säugergenen oder Säugerviren geeignet. Geeignete Promotoren können konstitutiv sein, Zelltyp-spezifisch, Stadium-spezifisch und/oder modulierbar oder regulierbar (z.B. durch Hormone, wie beispielsweise Glucocorticoide). Zu nützlichen Promotoren zählen, jedoch ohne Beschränkung darauf, der Metallothionein-Promotor, der konstitutive «Major late»-Promotor von Adenovirus, der Dexamethason-induzierbare MMTV, der SV40-Promotor, der MRP polIII-Promotor, der konstitutive MPSV-Promotor, der Tetracyclin-induzierbare CMV-Promotor (wie beispielsweise der menschliche «immediate-early» CMV-Promotor), der konstitutive CMV-Promotor und auf dem Fachgebiet bekannte Promotor-Enhancer-Kombinationen.

Für eine effiziente Expression eines hTRT-Polynucleotids und/oder die Translation einer hTRT-Proteine codierenden Sequenz können auch weitere regulatorische Elemente erforderlich oder erwünscht sein. Für die Translation beinhalten diese Elemente typischerweise ein ATG-Initiationscodon und eine benachbarte Ribosomen-Bindungsstelle oder andere Sequenzen. Für das hTRT-Protein codierende Sequenzen sind, falls dessen Initiationscodon und stromaufwärts gelegene Promotorsequenzen in einen Expressionsvektor inseriert sind, keine zusätzlichen Translations-signale oder andere Kontrollsignale erforderlich. In Fällen jedoch, in denen nur eine codierende Sequenz oder ein Teil davon inseriert ist, müssen oft exogene Transkriptions- und/oder Translations-Kontrollsignale (z.B. der Promotor, die Ribosomenbindungsstelle und das ATG-Initiationscodon) bereitgestellt werden. Darüber hinaus muss das Initiationscodon typischerweise im korrekten Leserahmen vorliegen, um die Translation des gewünschten Proteins zu gewährleisten. Exogene Transkriptionselemente und Initiationscodons können von zahlreichen Quellen, sowohl natürlichen als auch synthetischen, stammen. Zusätzlich kann die Effizienz der Expression durch die Einfügung von für das verwendete Zellsystem geeigneten Enhancern verstärkt werden (Scharf et al., *Results Probl. Cell Differ.* 20 (1994), 125 und Bittner et al., *Meth. Enzymol.* 153 (1987), 516). Beispielsweise kann zur Steigerung der Expression in Säuger-Wirtszellen der SV40-Enhancer oder der CMV-Enhancer verwendet werden.

Die Expression von hTRT-Genprodukten kann auch durch Aktivierung eines hTRT-Promotors oder Enhancers in einer Zelle, wie beispielsweise einer menschlichen Zelle, z.B. einer Telomerase-negativen Zelllinie, bewirkt (erhöht) werden. Die Aktivierung kann durch eine Reihe von unterschiedlichen Massnahmen erreicht werden. Dazu zählen die Verabreichung eines einen exogenen Promotor aktivierenden Agens oder die Hemmung eines zellulären Bestandteils, der die Expression des hTRT-Gens unterdrückt. Natürlich wird umgekehrt die Hemmung der Promotorfunktion, so wie dies nachstehend beschrieben ist, die hTRT-Genexpression herabsetzen.

Die Erfindung stellt die induzierbare und reprimierbare Expression von hTRT-Polypeptiden unter Verwendung solcher Systeme wie des Ecdyson-induzierbaren Expressionssystems (Invitrogen) und die «Tet-On and Tet-off» Tetracyclin-regulierten Systeme von Clontech bereit. Bei dem durch Ecdyson induzierbaren Expressionssystem wird ein Analogon des Steroidhormons Ecdyson, Muristeron A zur Aktivierung der Expression eines rekombinanten Proteins über einen heterodimären nucleären Rezeptor verwendet (No et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93 (1996), 3346). In einer Ausführungsform wird hTRT in den pIND-Vektor (Clontech) cloniert, der fünf modifizierte Ecdyson-Reaktionselemente (E/GRES) stromaufwärts eines minimalen Hitzeschockpromotors und der Mehrfachclonierungsstelle enthält. Dieses Konstrukt wird dann in den Ecdyson-Rezeptor stabil exprimierenden Zelllinien transfiziert. Nach der Transfektion werden die Zellen zur Induktion der intrazellulären Expression von pIND mit Muristeron A behandelt. In einer anderen Ausführungsform wird das hTRT-Polypeptid unter Verwendung der «Tet-on and Tet-off»-Expressionssysteme (Clontech) neben den beschriebenen regulierten Hochniveau-Genexpressionssystemen exprimiert (Gossen et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89 (1992), 5547 und Gossen et al., *Science* 268 (1995), 1766).

Die erfindungsgemässen hTRT-Vektoren können in eine Zelle, ein Gewebe, Organ, einen Patienten oder ein Tier durch eine Reihe von Verfahren eingeführt werden. Die erfindungsgemässen Nucleinsäureexpressionsvektoren (typischerweise dsDNA) können in die gewählte Wirtszelle durch allgemein bekannte Verfahren wie die Calciumchlorid-Transformation (für bakterielle Systeme), Elektroporation, Calciumphosphat-Behandlung, Liposomen-vermittelte Transformation, Injektion und Mikroinjektion, ballistische Verfahren, Virosomen, Immunoliposomen, Polykation:Nucleinsäure-Konjugate, nackte DNA, künstliche Virione, Fusion an das Herpesvirus-Strukturprotein VP22 (Elliot und O'Hare, *Cell* 88, 223) durch Agens-verstärkte Aufnahme von DNA und ex-vivo-Transduktion transferiert werden. Nützliche Liposomen-vermittelte DNA-Transferverfahren sind in den US-Patenten Nr. 5 049 386, 4 946 787 und 4 897 355, in den PCT-Veröffentlichungen WO 91/17 424 und WO 91/16 024 beschrieben sowie in Wang und Huang, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 147 (1987), 980; Wang und Huang, *Biochemistry* 28 (1989), 9508; Litzinger und Huang, *Biochem. Biophys. Acta* 1113 (1992), 201; Gao und Huang, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 179 (1991), 280. Immunliposomen als Träger für exogene Polynucleotide wurden ebenfalls beschrieben (Wang und Huang, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84 (1987), 7851 und Trubetskoy et al.,

Biochem. Biophys. Acta 1131 (1992), 311). Diese dürften im Vergleich zu Liposomen eine verbesserte Zelltyp-Spezifität aufgrund des Einschlusses von spezifischen Antikörpern, die vermutlich an Oberflächenantigene auf spezifischen Zelltypen binden, verbesserte Zelltypenspezifität aufweisen. Behr et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86 (1989), 6982, berichten über die Verwendung von Lipopolyamin als ein Reagenz zur Vermittlung der Transfektion selbst, wobei es nicht nötig ist, zur Bildung von Liposomen irgendein zusätzliches Phospholipid zuzugeben. Geeignete Einführungsverfahren können vom Fachmann im Hinblick auf geeignete Praktiken und Erfordernisse bezüglich der Regulation (z.B. zur Gentherapie oder zur Herstellung von Zelllinien zur Expression von rekombinanten Proteinen) ausgewählt werden. Natürlich können die oben aufgezählten Einführungsverfahren auch zum Transfer von Nucleinsäuren in Zellen für die Gentherapie, den Transfer in Gewebekulturzellen etc. verwendet werden.

Für die langfristige Herstellung von rekombinanten Proteinen mit hoher Ausbeute ist oft eine stabile Expression erwünscht. Beispielsweise können hTERT stabil exprimierende Zelllinien unter Verwendung der erfindungsgemässen Expressionsvektoren hergestellt werden, die virale Replikationsursprünge oder endogene Expressionselemente und ein selektierbares Markergen enthalten. Nach der Einschleusung des Vektors kann man die Zellen 1 bis 2 Tage in angereicherten Medien wachsen lassen, bevor man zu Selektivmedien wechselt. Der selektierbare Marker dient dazu, zur Selektion eine Resistenz zu verleihen. Seine Gegenwart erlaubt das Wachstum von Zellen, die die eingeschleusten Sequenzen in Selektivmedien erfolgreich exprimieren. Resistente und stabil transfizierte Zellen können unter Verwendung von für den entsprechenden Zelltyp geeigneten Gewebekulturverfahren vermehrt werden. Ein Amplifikationsschritt kann eingefügt werden, beispielsweise durch Verabreichung von Methyltrexat an mit einem DHFR-Gen transfizierten Zellen gemäss auf dem Fachgebiet allgemein bekannter Verfahren.

Zusätzlich kann ein Wirtszellstamm gewählt werden hinsichtlich seiner Fähigkeit, die Expression der inserierten Sequenzen zu modulieren oder das exprimierte Protein auf die gewünschte Weise zu prozessieren. Zu solchen Modifikationen des Polypeptids zählen, allerdings ohne Beschränkung darauf, Acetylierung, Carboxylierung, Phosphorylierung, Lipidierung und Acylierung. Die post-translationale Prozessierung kann auch für die korrekte Insertion, Faltung und/oder Funktion wichtig sein. Die verschiedenen Wirtszellen verfügen über eine zelluläre Maschinerie und charakteristische Mechanismen für solche post-translationale Aktivitäten, die für jede Zelle spezifisch sind. Somit kann eine bestimmte Zelle zur Gewährleistung der korrekten Modifikation und Prozessierung des eingeschleusten Fremdproteins gewählt werden.

Die vorliegende Erfindung stellt auch transgene Tiere (d.h. Säuger, die bezüglich einer menschlichen oder anderen TERT-Gensequenz transgen sind), bereit, die ein hTERT- oder ein anderes TERT-Polynucleotid oder Polypeptid exprimieren. In einer Ausführungsform wird hTERT in der Milch eines transgenen Säugers, wie beispielsweise eines transgenen Rinds, einer Ziege oder eines Kaninchens, sezerniert. Verfahren zur Herstellung solcher Tiere können beispielsweise in Heyneker et al., PCT WO 91/08 216 gefunden werden.

Die erfindungsgemässen hTERT-Proteine und Komplexe, zu denen die durch die vorstehend beschriebenen Expressionssysteme hergestellten zählen, können unter Verwendung einer Reihe von allgemeinen, auf dem Fachgebiet bekannten Verfahren in Übereinstimmung mit den durch die vorliegende Erfindung bereitgestellten spezifischen Verfahren (wie beispielsweise nachstehend beschrieben) gereinigt werden. Es ist für den Fachmann offensichtlich, dass nach chemischer Synthese, biologischer Expression oder Reinigung das hTERT-Protein eine Konformation besitzen kann, die sich von der nativen Konformation von natürlich vorkommender Telomerase unterscheidet. In einigen Fällen mag es hilfreich oder sogar nötig sein, das Polypeptid zu denaturieren (was beispielsweise die Reduktion von Disulfid- oder anderen Bindungen beinhalten kann) und danach das Polypeptid zu einer Rückfaltung in die bevorzugte Konformation zu bringen. Eine korrekte Rückfaltung kann auch die Gegenwart von hTERT (oder hTERT-Fragmenten) erforderlich machen. Verfahren zur Reduktion und Denaturierung von Proteinen und zur Induktion der Rückfaltung sind dem Fachmann bekannt (siehe beispielsweise Debinski et al. J. Biol. Chem. 268 (1993), 14065; Kreitman und Pastan, Bioconjug. Chem. 4 (1993), 581; und Buchner et al. Anal Biochem. 205 (1992), 263 und McCaman et al., J. Biotech. 2 (1985), 177). (Siehe auch USSN 08/478 352, eingereicht am 7. Juni 1995, a.a.O.).

D. Komplexe aus menschlicher TERT und menschlicher Telomerase-RNA, Telomerase-assoziierten Proteinen und anderen Biomolekülen, die durch Coexpression und andere Mittel hergestellt werden

Erfindungsgemässe hTERT-Polypeptide können in vivo und in vitro mit anderen Biomolekülen assoziieren, wozu RNAs (z.B. hTERT), Proteine (z.B. Telomerase-assoziierte Proteine), DNA (z.B. Telomer-DNA, [T<sub>2</sub>AG<sub>3</sub>]<sub>N</sub>) und Nucleotide wie (Desoxy)ribonucleotid-triphosphate gehören. Diese Assoziationen können dazu verwendet werden, um die Anwesenheit oder Funktion von hTERT nachzuweisen, um hTERT oder Telomerase-assoziierte Moleküle zu identifizieren oder zu reinigen und um die Struktur oder Funktion von hTERT oder Telomerase gemäss den erfindungsgemässen Verfahren zu analysieren.

In einer Ausführungsform stellt die vorliegende Erfindung hTERT bereit, das mit einer Nucleinsäure, üblicherweise einer RNA einen Komplex bildet (z.B. damit assoziiert oder daran gebunden ist). In einer Ausführungsform kann die gebundene RNA als eine Matrize für eine Telomerase-vermittelte DNA-Synthese fungieren. Zu den Beispielen für RNAs, die mit dem hTERT-Polypeptid einen Komplex bilden kön-

nen, zählen eine natürlich vorkommende Wirtszell-Telomerase-RNA, eine menschliche Telomerase-RNA (z.B. hTR; US-Patent Nr. 5 583 016), eine hTR-Untersequenz oder -Domäne, eine synthetische RNA oder andere RNAs. Der RNA-hTRT-Proteinkomplex (ein RNP) weist typischerweise ein oder mehrere Telomerase-Aktivitäten auf, beispielsweise katalytische Aktivitäten von Telomerase. Dies hTRT-hTR-RNPs (oder andere hTRT-RNA-Komplexe) können mittels einer Reihe von Verfahren, wie sie nachstehend zur Veranschaulichung beschrieben sind, hergestellt werden, dazu gehören in vitro-Rekonstitution und Coexpression von hTRT und hTR (und einer anderen RNA) in vitro (d.h. in einem zellfreien System) in vivo oder ex vivo.

Somit stellt die vorliegende Erfindung in einer Ausführungsform einen hTRT-hTR-Komplex (oder einen anderen hTRT-RNA-Komplex) bereit, der in vitro durch Mischen getrennt gereinigter Bestandteile gebildet wurde («in vitro-Rekonstitution»; siehe beispielsweise US-Patent Nr. 5 583 016 bezüglich einer Beschreibung der Rekonstitution und USSN 08/478 352, eingereicht am 7. Juni 1995; siehe auch Autexier et al., EMBO J. 15; 5928).

In einer alternativen Ausführungsform stellt die Erfindung Telomerase-RNPs bereit, die durch Coexpression des hTRT-Polypeptids und einer RNA (z.B. hTR) in vitro in einem zellfreien Transkriptions/Translations-System (z.B. Weizenkeimlysat oder Kaninchen-Reticulocytenlysate) hergestellt wurden. Wie in Beispiel 7 gezeigt, führt die Coexpression eines rekombinanten hTRT-Polypeptids und von hTR in vitro zur Herstellung von katalytischer Aktivität von Telomerase (gemessen durch einen TRAP-Assay).

Die vorliegende Erfindung stellt darüber hinaus Telomerase-RNPs bereit, die durch Expression des hTRT-Polypeptids in einer Zelle, beispielsweise einer Säugerzelle, hergestellt werden, in der hTR natürlicherweise exprimiert wird, oder in die hTR (oder eine andere RNA, die mit dem hTRT-Protein einen Komplex bilden kann) eingeführt wird, oder durch Rekombination exprimiert wird. Somit wird in einer Ausführungsform hTRT in einer Telomerase-negativen menschlichen Zelle, in der hTR vorhanden ist (z.B. BJ- oder IMP90-Zellen) exprimiert, was die Assemblierung beider Moleküle zu einem RNP erlaubt. In einer weiteren Ausführungsform wird hTRT in einer menschlichen oder nicht-menschlichen Zelle, in der hTR rekombinant exprimiert wird, exprimiert. Verfahren zur Expression von hTR in einer Zelle können in dem US-Patent 5,583,016 gefunden werden. Der Clon pGRN33, der eine die RNA-Komponente von Telomerase codierende cDNA enthält, wurde ferner hinterlegt (ATCC 75926). Die RNA-Komponente von menschlicher Telomerase codierenden genomischen Sequenzen wurden als 15 kb SaullIA1 bis HindIII-Insertion des Clons 28-1 hinterlegt (ATCC 75925). Zur Expression in eukaryotischen Zellen wird die hTRT-Sequenz typischerweise mit einer Transkriptions-Initiationssequenz (RNA-Polymerase-Bindungsstelle) und Transkriptions-Terminationssequenzen funktionell verknüpft (siehe beispielsweise PCT-Veröffentlichung WO 96/01 835; Feng et al., Science 269 (1995), 1236).

Die vorliegende Erfindung stellt darüber hinaus rekombinant hergestellte oder im wesentlichen gereinigte hTRT-Polypeptide bereit, die mit sogenannten «Telomerase-assoziierten Proteinen» coexprimiert und/oder assoziiert sind. Somit stellt die vorliegende Erfindung hTRT bereit, das mit anderen Proteinen (z.B. Telomerase-assoziierten Proteinen) coexprimiert wird oder mit diesen einen Komplex bildet. Unter Telomerase-assoziierten Proteinen versteht man solche Proteine, die mit menschlicher Telomerase mit aufgereinigt werden und/oder eine Rolle bei der Modulation der Telomerasenfunktion oder -Aktivität spielen können, beispielsweise dadurch, dass sie an der Assoziation von Telomerase mit Telomer-DNA beteiligt sind. Zu den Beispielen für Telomerase-assoziierte Proteine gehören (jedoch ohne Beschränkung darauf) die folgenden Proteine und/oder ihre menschlichen Homologe: Nucleolin (siehe die parallele US-Patentanmeldung mit der Serien-Nr. 08/833 377 und Srivastava et al., FEBS Letts. 250 (1989), 99); EF2H (das Homolog zum Elongationsfaktor 2; siehe die parallele US-Patentanmeldung Nr. 08/833 377 und Nomura et al., DNA Res. (Japan) 1 (1994), 27, GENBANK Zugangsnummer #D21163), TP1/TLP1 (Harrington et al., Science 275 (1997), 973); Nakayama et al., Cell 88 (1997), 875; das menschliche Homolog zu Tetrahymena p95 (Collins et al., Cell 81 (1995) 677); TPC2 (ein die Telomerlänge regulierendes Protein; ATCC-Zugangsnummer 97708 (siehe USSN 08/710 249 und 08/713 922, beide am 13. September 1996 eingereicht)), TPC3 (ebenfalls ein die Telomerlänge regulierendes Protein; ATCC-Zugangsnummer 97707 (siehe USSN 08/710 249 und 08/713 922, beide eingereicht am 13. September 1996)), DNA-bindendes Protein B (dbpB; Horwitz et al., J. Biol. Chem. 269 (1994), 14130) und der die Telomer-Wiederholungseinheit bindende Faktor (TRF 1 & 2; Chang et al., Science 270 (1995), 1663; Chong et al., Hum. Mol. Genet. 6 (1997), 69; EST1, 3 und 4 (Lendvay et al., Genetics 144 (1996), 1399; Nugent et al., Science 274 (1996), 249 und Lundblad et al., Cell 57 (1989), 633) und der «End-capping»-Faktor (Cardenas et al., Genes Dev. 7 (1993), 883).

Telomerase-assoziierte Proteine können auf der Basis der Mitaufreinigung mit oder der Bindung an hTRT-Protein oder das hTRT-hTR-RNP identifiziert werden. In einer alternativen Ausführungsform können sie auf der Basis der Bindung an ein hTRT-Fusionsprotein, beispielsweise ein GST-hTRT-Fusionsprotein etc. identifiziert werden, wie dies durch Affinitätsreinigung erfolgen kann (siehe Ausubel et al., Kapitel 20). Ein besonders nützliches Verfahren zur Bestimmung von Protein/Protein-Interaktionen und zur Identifizierung von hTR-T-assoziierten Proteinen ist das «two hybrid screen»-Verfahren von Chien et al. (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88 (1991), 9578; siehe auch Ausubel et al., a.a.O., Kapitel 20). Durch dieses Screenen können Protein/Protein-Interaktionen in vivo durch Rekonstitution eines Transkriptions-aktivators, dem Hef -Ga14-Transkriptionsprotein identifiziert werden (siehe Fields und Song, Nature 340 (1989), 245). Dieses Verfahren basiert auf den Eigenschaften des Hefe-Ga14-Proteins, das aus trenn-

5      baren Domänen besteht, die für die DNA-Bindung und transkriptionelle Aktivierung verantwortlich sind. «Two hybrid»-Proteine codierende Polynucleotide, üblicherweise Expressionsvektoren, werden konstruiert. Ein Polynucleotid umfasst die Hefe-Ga14-DNA-bindende Domäne, die an eine Polypeptidsequenz eines auf eine hTRT-Interaktion zu testenden Proteins fusioniert ist (z.B. Nucleolin oder EF2H). In einer alternativen Ausführungsform ist die Hefe-Ga14-DNA-bindende Domäne an cDNAs aus einer menschlichen Zelle fusioniert, wodurch eine Bank von menschlichen Proteinen, die an die Ga14DNA-bindende Domäne fusioniert sind, zum Screenen nach Telomerase-assoziierten Proteinen hergestellt wird. Die anderen Polynucleotide umfassen die Ga14-Aktivierungsdomäne, die an eine hTRT-Polypeptidsequenz fusioniert ist. Die Konstrukte werden in eine Hefewirtszelle eingeführt. Nach Expression kann die intermolekulare Bindung zwischen hTRT und dem Testprotein die Ga14-DNA-bindende Domäne mit der Ga14-aktivierenden Domäne rekonstituieren. Dies führt zu der transkriptionellen Aktivierung eines Reportergens (z.B. lacZ, His3), das mit einer Ga14-Bindungsstelle funktionell verknüpft ist. Durch Auswählen oder Untersuchung können Reporter-gen-Zellkolonien identifiziert werden, die ein mit hTRT interagierendes Protein oder ein Telomerase-assoziiertes Protein enthalten. Für den Fachmann ist es offensichtlich, dass es zahlreiche Variationen des «2-hybrid-screen»-Systems gibt, beispielsweise das LexA-System (Bartel et al., in Cellular Interactions in Development: A Practical Approach, Hartley (Herausg.), D.A. (Oxford Univ. Press (1993), S. 153–179)).

10      Ein weiteres nützliches Verfahren zum Identifizieren von Telomerase-assoziierten Proteinen ist ein «three-hybrid»-System (siehe beispielsweise Zhang et al., Anal. Biochem. 242 (1996), 68 und Licitra et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93 (1996), 12817). Die Telomerase-RNA-Komponente kann in diesem System mit der TRT oder dem hTRT-Protein und einem Testprotein verwendet werden. Ein weiteres nützliches Verfahren zur Identifizierung von interagierenden Proteinen (d.h. von Proteinen, die heterodimerisieren oder Heteromultimere höherer Ordnung bilden) ist insbesondere das E.coli/BCCP «interaktive Screening»-System (siehe Germino et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90 (1993), 933 und Guarente, Proc. Natl. Acad. Sci. (USA), 90 (1993), 1639).

15      Die vorliegende Erfindung stellt auch Komplexe aus Telomerbindenden Proteinen bereit (bei denen es sich um Telomeraseassoziierte Proteine handeln kann oder nicht) und hTRT (die mit hTR, anderen RNAs oder einem oder mehreren Telomeraseassoziierten Proteinen komplexiert sein kann oder nicht). Zu den Beispielen von Telomer-bindenden Proteinen gehören TRF1 und TRF2 (a.a.O.) rnpA1, rnpA2, RAP1 (Buchman et al., Mol. Cell. Biol. 8 (1988), 210, Buchman et al., Mol. Cell. Biol. 8 (1988), 5086), SIR3 und SIR4 (Aparicio et al., Cell 66 (1991), 1279), TEL1 (Greenwell et al., Cell 82 (1995), 823; Morrow et al., Cell 82 (1995), 831); ATM (Savitsky et al., Science 268 (1995), 1749), «end-capping»-Faktor (Cardenas et al., Genes Dev. 7 (1993), 883) und die entsprechenden menschlichen Homologe. Die vorstehend erwähnten Komplexe können allgemein, so wie es vorstehend für Komplexe aus hTRT und hTR oder Telomerase-assoziierten Proteinen beschrieben wurde, hergestellt werden, beispielsweise durch Vermischen oder Coexpression in vitro oder in vivo.

#### V. Antikörper und andere bindende Agenzien

40      Ein verwandter Aspekt der vorliegenden Erfindung betrifft Antikörper, die mit hTRT spezifisch immunreaktiv sind. Dazu gehören polyclonale und monoclonale Antikörper, Antikörperfragmente, Antikörper mit einer einzelnen Kette, menschliche und chimäre Antikörper, einschliesslich Antikörper oder Antikörper-Fragmente, die an Phagenhüll- oder Zelloberflächenproteine fusioniert sind und weitere auf dem Fachgebiet bekannte und hier beschriebene. Die erfindungsgemässen Antikörper können Polypeptide spezifisch erkennen und binden, die eine Aminosäuresequenz aufweisen, die mit der Aminosäuresequenz von SEQ. ID. Nr. 2 im wesentlichen identisch ist, oder ein immunogenes Fragment davon, oder ein Epitop auf dem dadurch definierten Protein. Die erfindungsgemässen Antikörper können eine spezifische Bindungsaffinität für hTRT von mindestens etwa  $10^7$ ,  $10^8$ ,  $10^9$  oder  $10^{10}$  M<sup>-1</sup> aufweisen. Sie können polyclonal oder monoclonal sein, rekombinant oder auf andere Weise hergestellt. Die Erfindung stellt auch anti-hTRT-Antikörper bereit, die ein Konformationsepitop von hTRT erkennen (beispielsweise ein Epitop auf der Oberfläche des hTRT-Proteins oder eines Telomerase-RNPs). Wahrscheinliche Konformations-epitope können, falls erwünscht, durch computergestützte Analyse der hTRT-Proteinsequenz identifiziert werden, durch Vergleich mit der Konformation von verwandten reversen Transkriptasen, wie beispielsweise der p66-Untereinheit von HIF-1 (siehe beispielsweise Fig. 3) oder empirisch. Anti-hTRT-Antikörper, die Konformationsepitope erkennen, sind unter anderem bei dem Nachweis und der Reinigung von menschlicher Telomerase und bei der Diagnose und der Behandlung von menschlichen Erkrankungen von Nutzen.

55      Für die Herstellung von anti-hTRT-Antikörpern können Wirte wie beispielsweise Ziegen, Schafe, Kühe, Meerschweinchen, Kaninchen, Ratten oder Mäuse durch Injektion mit einem hTRT-Protein oder einem beliebigen Anteil, einem Fragment oder Oligopeptid davon, der immunogene Eigenschaften beibehalten hat, immunisiert werden. Für die Auswahl von hTRT-Polypeptiden zur Antikörperinduktion ist es nicht nötig, dass diese biologische Aktivität beibehalten wird, das Proteinfragment oder Oligopeptid muss jedoch immunogen und vorzugsweise antigen sein. Die Immunogenität kann durch Injektion eines Polypeptids und in s Adjuvans in ein Tier (z.B. ein Kaninchen) und durch Untersuchung des Auftretens von Antikörpern, die gegen das injizierte Polypeptid gerichtet sind, nachgewiesen werden (siehe

beispielsweise Harlow und Lane, *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, New York (1988), beispielsweise Kapitel 5, und dieses Dokument ist durch Bezugnahme in seiner Gesamtheit und für alle Zwecke Bestandteil dieser Beschreibung). Zur Induktion spezifischer Antikörper verwendete Peptide weisen typischerweise eine Aminosäuresequenz auf, die aus mindestens fünf Aminosäuren besteht, vorzugsweise mindestens 8 Aminosäuren und mehr bevorzugt mindestens 10 Aminosäuren. Üblicherweise nehmen sie die gesamte Aminosäuresequenz des Proteins mit SEQ. ID. Nr. 2 oder einen Teil davon auf, oder besitzen eine dazu im wesentlichen identische Sequenz. Kurze Strecken der Aminosäure des hTERT-Proteins können mit denen anderer Proteine fusioniert werden, wie beispielsweise das «Keyhole limpet»-Hemocyanin und einen anti-hTERT-Antikörper, der gegen das chimäre Molekül hergestellt wurde. In Abhängigkeit von der verwendeten Wirtsart können verschiedene Adjuvantien zur Steigerung der Immunantwort verwendet werden.

Das Antigen wird dem Immunsystem auf eine Weise präsentiert, die durch für das Tier geeignete Verfahren ermittelt wurde. Diese sowie andere Parameter sind dem Immunologen im allgemeinen gut bekannt. Typischerweise werden die Injektionen in die Fussballen, intramuskulär, intradermal, in die Perilymphknoten oder intraperitoneal verabreicht. Die durch den Wirt hergestellten Immunglobuline können präzipitiert, isoliert und gemäss Routineverfahren, zu denen Affinitätsreinigung zählt, gereinigt werden.

Veranschaulichende Beispiele von immunogenen hTERT-Peptiden werden in Beispiel 8 bereitgestellt. Zusätzlich beschreibt Beispiel 8 die Herstellung und die Verwendung von polyclonalen anti-hTERT-Antikörpern.

#### A) Monoclonale Antikörper

Monoclonale Antikörper gegen hTERT-Proteine und Peptide können in Übereinstimmung mit den erfindungsgemässen Verfahren unter Verwendung jedes Verfahrens, das für die Herstellung von Antikörpermolekülen durch kontinuierliche Zelllinien in Kultur geeignet ist, hergestellt werden. Zu diesen Verfahren zählen, jedoch ohne Beschränkung darauf, das ursprünglich beschriebene Hybridom-Verfahren von Köhler und Milstein (*Nature* 256 (1975), 495), das Hybridom-Verfahren mit menschlichen B-Zellen (Kosbor et al., *Immunol. Today* 4 (1983), 72 und Cote et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80 (1983), 2026), und das EBV-Hybridom-Verfahren (Cole et al. *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, Alan R. Liss Inc. New York NY, S. 77-96 (1985)).

In einer Ausführungsform werden geeignete Tiere ausgewählt und das geeignete anzuwendende Immunisierungsprotokoll. Die Herstellung von nicht-menschlichen monoclonalen Antikörpern, beispielsweise von der Maus, von Lagomorpha und vom Pferd ist allgemein bekannt und kann beispielsweise durch Immunisierung eines Tiers mit einer hTERT oder Fragmente davon enthaltenden Präparation erfolgen. In einem Verfahren wird nach einem geeigneten Zeitraum die Milz der Tiere herausgeschnitten und einzelne Milzzellen werden typischerweise mit immortalisierten Myelomzellen unter geeigneten Selektionsbedingungen fusioniert. Danach werden die Zellen clonal getrennt und die Überstände von jedem Clon (z.B. Hybridom) bezüglich der Herstellung eines geeigneten Antikörpers, der für den gewünschten Bereich des Antigens spezifisch ist, getestet. Verfahren zur Herstellung von Antikörpern sind auf dem Fachgebiet allgemein bekannt. Siehe beispielsweise Goding et al., *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice* (2. Ausgabe), Acad. Press, N.Y., und Harlow und Lane, a.a.O., wobei beide Veröffentlichungen durch Bezugnahme in ihrer Gesamtheit und für alle Zwecke als Bestandteil dieser Beschreibung anzusehen sind. Zu anderen geeigneten Verfahren zählen die in vitro-Exposition von Lymphocyten gegenüber den antigenen Polypeptiden oder, alternativ, eine Auswahl von Antikörperbanken in Phagenvektoren oder ähnlichen Vektoren (siehe die nachstehende Beschreibung).

#### B) Menschliche Antikörper

Ein weiterer Aspekt der Erfindung betrifft die Bereitstellung von menschlichen Antikörpern gegen ein hTERT-Polypeptid. Menschliche monoclonale Antikörper gegen ein bekanntes Antigen können auch unter Verwendung von transgenen Tieren hergestellt werden, die Elemente eines menschlichen Immunsystems besitzen (siehe beispielsweise USPatent Nr. 5 569 825 und 5 545 806, wobei beide Dokumente durch Bezugnahme in ihrer Gesamtheit und für alle Zwecke als Bestandteil dieser Beschreibung anzusehen sind) oder unter Verwendung von menschlichen peripheren Blutzellen (Casali et al., *Science* 234 (1986), 476). Einige menschliche Antikörper werden durch kompetitive Bindungsexperimente ausgewählt oder so, dass sie dieselbe Epitop-Spezifität aufweisen wie ein spezieller Mausantikörper.

In einer weiteren Ausführungsform können menschliche Antikörper gegen ein hTERT-Polypeptid durch Screenen einer DNA-Bank aus menschlichen B-Zellen gemäss dem von Huse et al., *Science* 246 (1989), 1275 beschriebenen allgemeinen Protokoll hergestellt werden. Dieses Dokument ist aufgrund der Bezugnahme ebenfalls als Teil der vorliegenden Beschreibung anzusehen. An das hTERT-Polypeptid bindende Antikörper werden ausgewählt. Diese Antikörper (oder ein bindendes Fragment) codierenden Sequenzen werden dann cloniert und amplifiziert. Das von Huse beschriebene Protokoll wird oft mit der «phage-display»-Technologie verwendet.

## C. Humanisierte oder chimäre Antikörper

Die Erfindung stellt auch anti-hTRT-Antikörper bereit, die als chimäre, menschlichen Antikörper ähnelnden oder humanisierte Antikörper hergestellt wurden, um so ihre potentielle Antigenität jedoch nicht ihre Affinität gegenüber dem Ziel herabzusetzen. Die Herstellung von chimären und humanisierten Antikörpern bzw. von den menschlichen Antikörpern ähnelnden Antikörpern wurde auf dem Fachgebiet beschrieben (siehe beispielsweise US-Patent Nr. 5 585 089 und 5 530 101; Queen et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86 (1989), 10029 und Verhoeyan et al., Science 239 (1988), 1534, wobei diese Dokumente aufgrund der Bezugnahme in ihrer Gesamtheit und für alle Zwecke als Gegenstand dieser Beschreibung anzusehen sind). Humanisierte Immunglobuline weisen variable Grundgerüstbereiche auf, die im wesentlichen von einem humanen Immunglobulin stammen (mit der Bezeichnung Akzeptor-Immunglobulin) und die Komplementarität der determinierenden Bereiche, die im wesentlichen von einem nicht-menschlichen Immunglobulin (z.B. von der Maus) stammen (mit der Bezeichnung Donor-Immunglobulin). Die (Der) konstante(n) Bereich(e) stammt/stammen, falls vorhanden, auch im wesentlichen von einem menschlichen Immunglobulin.

Bei einigen Anwendungen, beispielsweise bei der Verabreichung an menschliche Patienten, bieten die erfindungsgemässen humanisierten (sowie die menschlichen) anti-hTRT-Antikörper eine Reihe von Vorteilen gegenüber Antikörpern von Mäusen oder anderen Spezies: (1) das menschliche Immunsystem sollte das Grundgerüst oder den konstanten Bereich des humanisierten Antikörpers nicht als fremd erkennen und daher sollte die Antikörper-Antwort gegen einen solchen injizierten Antikörper geringer ausfallen als gegen einen vollständig fremden Maus-Antikörper oder einen partiell fremden chimären Antikörper; (2) da der Effektorbereich des humanisierten Antikörpers menschlich ist, dürfte er mit anderen Teilen des menschlichen Immunsystems besser interagieren, und (3) injizierte humanisierte Antikörper weisen eine Halbwertszeit auf, die im wesentlichen zu der von natürlich vorkommenden menschlichen Antikörpern äquivalent ist, was es erlaubt, kleinere und weniger häufige Dosen im Vergleich zu Antikörpern anderer Spezies zu verabreichen.

## D) «Phage Display»

Die vorliegende Erfindung stellt auch anti-hTRT-Antikörper (oder bindende Zusammensetzung) bereit, die durch «phage display»-Verfahren hergestellt wurden (siehe beispielsweise Dower et al. WO 91/17 271 und McCafferty et al., WO 92/01 047 sowie Vaughan et al., Nature Biotechnology 14 (1996), 309, wobei diese Dokumente aufgrund der Bezugnahme in ihrer Gesamtheit und für alle Zwecke als Bestandteil dieser Beschreibung anzusehen sind). Bei diesen Verfahren werden Phagenbanken hergestellt, in denen Mitglieder auf ihren äusseren Oberflächen unterschiedliche Antikörper präsentieren. Antikörper werden gewöhnlich als Fv- oder Fab-Fragmente präsentiert. Phagen, die Antikörper mit einer gewünschten Spezifität präsentieren, werden durch Affinitätsanreicherung mit einem hTRT-Polypeptid ausgewählt.

Bei einer Variation des «phage-display»-Verfahrens können humanisierte Antikörper mit der Bindungsspezifität eines ausgewählten Maus-Antikörpers hergestellt werden. Bei diesem Verfahren wird der variable Bereich entweder der schweren oder der leichten Kette des ausgewählten Maus-Antikörpers als Ausgangsmaterial verwendet. Wenn beispielsweise der variable Bereich einer leichten Kette als Ausgangsmaterial ausgewählt wird, wird eine Phagenbank hergestellt, in der Mitglieder den variablen Bereich derselben leichten Kette (d.h. des Ausgangsmaterials von der Maus) und einen variablen Bereich einer unterschiedlichen schweren Kette präsentieren. Die variablen Bereiche der schweren Kette werden von einer Bank mit menschlichen rearrangierten variablen Bereichen der schweren Kette erhalten. Ein Phage, der eine starke spezifische Bindung an das hTRT-Polypeptid zeigt (z.B. mindestens  $10^6$  und vorzugsweise mindestens  $10^9$  M<sup>-1</sup>) wird ausgewählt. Der variable Bereich der menschlichen schweren Kette von diesem Phagen dient dann als Ausgangsmaterial für die Herstellung einer weiteren Phagenbank. In dieser Bank präsentiert jeder Phage denselben variablen Bereich der schweren Kette, d.h. den von der ersten Präsentationsbank identifizierte Bereich, und einen unterschiedlichen Bereich der leichten Kette. Die variablen Bereiche der leichten Kette werden von einer Bank aus menschlichen rearrangierten variablen Regionen der leichten Kette erhalten. Wieder wird ein Phage, der eine starke spezifische Bindung zeigt, ausgewählt. Diese Phagen präsentieren die variablen Bereiche von vollständig menschlichen anti-hTRT-Antikörpern. Diese Antikörper weisen üblicherweise die gleiche oder eine ähnliche Epitopspezifität auf, wie das von der Maus stammende Ausgangsmaterial.

## E) Hybrid-Antikörper

Die Erfindung stellt auch Hybrid-Antikörper bereit, die die Spezifität mit Antikörpern gegen ein hTRT-Polypeptid gemeinsam haben, jedoch auch eine zweite Einheit spezifisch binden können. In diesen Hybrid-Antikörpern stammt normalerweise ein Paar aus einer schweren und leichten Kette von einem anti-hTRT-Antikörper und das andere Paar von einem Antikörper, der gegen ein anderes Epitop oder Protein gerichtet ist. Dies führt zu der Eigenschaft einer multifunktionellen Valenz, d.h. der Fähigkeit, mindestens zwei verschiedene Epitope gleichzeitig binden zu können, wobei mindestens ein Epitop das Epitop ist, an das der anti-Komplex-Antikörper bindet. Solche Hybride können durch Fusion der entspre-

chenden Bestandteilsantikörpern herstellenden Hybridome gebildet werden oder durch Kombinationsverfahren.

Erfindungsgemässe Immunglobuline können auch mit funktionellen Bereichen von anderen Genen (z.B. Enzymen) zur Herstellung von Fusionsproteinen (z.B. Immuntoxinen) mit nützlichen Eigenschaften fusioniert werden.

#### F) Anti-idiotypische Antikörper

Auch anti-idiotypische Antikörper, die mittels der vorstehend beschriebenen Verfahren isoliert werden können, sind von Nutzen. Anti-idiotypische Antikörper können beispielsweise durch Immunisierung eines Tiers mit dem primären Antikörper (d.h. anti-hTERT-Antikörpern oder hTERT-bindenden Fragmenten davon) präpariert werden. Für anti-hTERT-Antikörper werden anti-idiotypische Antikörper ausgewählt, deren Bindung an den primären Antikörper durch ein hTERT-Polypeptid oder Fragmente davon gehemmt wird. Da sowohl der anti-idiotypische Antikörper als auch das hTERT-Polypeptid oder Fragmente davon, das primäre Immunglobulin binden, kann das anti-idiotypische Immunglobulin das «interne Bild» eines Epitops repräsentieren und somit in Assays das hTERT-Polypeptid ersetzen, oder es kann dazu verwendet werden, anti-hTERT-Antikörper, beispielsweise in einem Patienten, zu binden (d.h. zu inaktivieren). Anti-idiotypische Antikörper können auch mit Telomeraseassoziierten Proteinen interagieren. Die Verabreichung solcher Antikörper könnte eine Telomerase-Funktion durch Austitrieren hTERT-assoziiierter Proteine beeinflussen.

#### G) Allgemeines

Die erfindungsgemässen Antikörper können zu einem beliebigen Isotyp gehören, beispielsweise IgM, IgD, IgG, IgA und IgE, wobei IgG, IgA und IgM oft bevorzugt sind. Humanisierte Antikörper können auch Sequenzen von mehr als einer Klasse oder eines Isotyps umfassen.

In einer weiteren erfindungsgemässen Ausführungsform werden Fragmente der intakten vorstehend beschriebenen Antikörper bereitgestellt. Typischerweise können diese Fragmente mit dem intakten Antikörper, von dem sie abstammen, um die spezifische Bindung an das hTERT-Polypeptid konkurrieren und sie binden mit einer Affinität von  $10^7$ ,  $10^8$ ,  $10^9$  M<sup>-1</sup>, oder  $10^{10}$  M<sup>-1</sup>. Zu den Antikörperfragmenten zählen getrennte schwere Ketten, leichte Ketten, Fab, Fab'F(ab')<sub>2</sub>, Fabc und Fv. Fragmente können durch enzymatische oder chemische Trennung von intakten Immunglobulinen hergestellt werden. Beispielsweise kann ein F(ab')<sub>2</sub>-Fragment aus einem IgG-Molekül durch proteolytische Spaltung mit Pepsin bei einem pH-Wert von 3,0–3,5 mit Standardverfahren, wie sie beispielsweise in Harlow und Lane, a.a.O., beschrieben sind, erhalten werden. Fab-Fragmente können aus F(ab')<sub>2</sub>-Fragmenten durch limitierte Reduktion aus einem ganzen Antikörper durch Spaltung mit Papain in Gegenwart von Reduktionsmitteln erhalten werden (siehe allgemein Paul, W. (Herausg.) Fundamental Immunology 2nd Raven Press, N.Y., 1989, Kapitel 7, wobei dieses Dokument durch Bezugnahme in seiner Gesamtheit und für alle Zwecke als Bestandteil dieser Beschreibung angesehen werden kann). Fragmente können auch durch DNA-Rekombinationsverfahren hergestellt werden. Nucleinsäuresegmente, die ausgewählte Fragmente codieren, werden durch Spaltung codierender Sequenzen vollständiger Länge mit Restriktionsenzymen hergestellt oder durch de novo-Synthese. Oft werden Fragmente in Form eines Phagen-Fusionshüllproteins exprimiert.

Viele der vorstehend beschriebenen Immunglobuline können unkritische Aminosäuresubstitutionen, Additionen oder Deletionen sowohl in den variablen als auch in den konstanten Bereichen ohne Verlust von Bindungsspezifität oder Effektorfunktionen oder nicht tolerierbare Herabsetzung der Bindungsaktivität (d.h. unter etwa  $10^7$  M<sup>-1</sup>) durchlaufen. Üblicherweise zeigen Immunglobuline mit solchen Änderungen eine im wesentlichen identische Sequenz, verglichen mit einem Referenzimmunglobulin von dem sie abstammen. Ein mutiertes Immunglobulin kann ausgewählt werden, das die gleiche Spezifität und eine erhöhte Affinität aufweist im Vergleich zu einem Referenzimmunglobulin, von dem es abstammt. Die «phage-display»-Technologie bietet nützliche Verfahren zur Selektion solcher Immunglobuline. Siehe beispielsweise Dower et al., WO 91/17 271, McCafferty et al., WO 92/01 047 und Huse, WO 92/06 204.

Die erfindungsgemässen Antikörper können mit oder ohne Modifikation verwendet werden. Häufig werden die Antikörper durch entweder kovalente oder nicht-kovalente Anfügung einer nachweisbaren Markierung markiert. Als markierte Bindungseinheiten sind die erfindungsgemässen Antikörper bei diagnostischen Anwendungen von besonderem Nutzen.

Die erfindungsgemässen anti-hTERT-Antikörper können unter Verwendung allgemein bekannter Verfahren gereinigt werden. Die vollständigen Antikörper, ihre Dimere, individuellen leichten und schweren Ketten oder andere erfindungsgemässen Immunglobulinformen können unter Verwendung der erfindungsgemässen Verfahren und Reagenzien in Übereinstimmung mit auf dem Fachgebiet üblichen Standardverfahren, zu denen Ammoniumsulfatpräzipitation, Affinitätssäulen, Säulenchromatographie, Gelelektrophorese etc. gehören, gereinigt werden (siehe allgemein Scopes, Protein Purification: Principles and Practice, 3. Ausgabe (Springer-Verlag, N.Y.; 1993). Bevorzugt sind im wesentlichen reine Immunglobuline mit mindestens etwa 90 bis 95% oder sogar 98 bis 99% oder darüber liegender Homogenität.



## VI. Reinigung von menschlicher Telomerase

Die vorliegende Erfindung stellt isolierte menschliche Telomerase mit bisher nicht erreichter Reinheit bereit. Insbesondere stellt die vorliegende Erfindung bereit: gereinigte hTERT rekombinanten oder nicht-rekombinanten Ursprungs; gereinigte hTERT-hTR-Komplexe (d.h. RNPs), rekombinanten, nicht-rekombinanten oder gemischten Ursprungs, die gegebenenfalls ein oder mehrere Telomeraseassoziierte Proteine umfassen; gereinigte natürlich vorkommende menschliche Telomerase; etc. Darüber hinaus stellt die Erfindung Verfahren und Reagenzien bereit, um die vorstehend beschriebenen Moleküle und Komplexe einschliesslich von Varianten, Fusionsproteinen, natürlich vorkommenden Proteinen etc. (die kollektiv als «hTERT und/oder hTERT-Komplexe» bezeichnet werden) in partiell gereinigter, im wesentlich gereinigter oder hochgereinigter Form gewinnen zu können. Bevor diese Erfindung gemacht wurde, wurden Versuche unternommen, den Telomerase-Enzym-Komplex bis zur Homogenität zu reinigen, jedoch mit begrenztem Erfolg (siehe beispielsweise die parallele US-Patentanmeldung mit der Serien-Nr. 08/833 377, eingereicht am 4. April 1997 und 08/510 736, eingereicht am 4. August 1995 sowie die PCT-Anmeldung Nr. 97/06 012, eingereicht am 4. April 1997. Diese Dokumente sind aufgrund der Bezugnahme als Bestandteil dieser Beschreibung hinsichtlich nützlicher Reinigungsverfahren anzusehen). Die in den vorstehend aufgeführten Anmeldungen bereitgestellten Verfahren erlauben es, Telomerase bis etwa 60 000fach oder höher im Vergleich zu Zellrohextrakten zu reinigen. Die vorliegende Erfindung stellt hTERT und hTERT-Komplexe mit sogar noch höherer Reinheit bereit, teilweise dank der neuen erfindungsgemässen Immunoaffinitätsreagenzien, (z.B. anti-hTERT-Antikörper) und/oder der hier für die rekombinante Expression von hTERT zur Verfügung gestellten Reagenzien, Zellen und Verfahren. Die rekombinante Expression von hTERT und hTERT-Komplexen erleichtert die Reinigung, da die gewünschten Moleküle in wesentlich höherer Konzentration im Vergleich zu den meisten in der Natur vorkommenden exprimierenden Zellen hergestellt werden und/oder weil die rekombinanten hTERT-Moleküle so modifiziert werden können (z.B. durch Fusion mit einem Epitop-«tag»), dass sie leicht gereinigt werden können.

Es ist offensichtlich, dass natürlich vorkommende Telomerase aus einer Telomerase-positiven Zelle gereinigt werden kann. Rekombinante hTERT und hTERT-Komplexe können u.a. unter Verwendung beliebiger in vitro, in vivo, ex vivo, pflanzlichen oder tierischen Expressionssystemen, die vorstehend beschrieben wurden, oder andere auf dem Fachgebiet bekannte Systeme exprimiert und gereinigt werden.

In einer Ausführungsform werden die hTERT, Telomerase und andere erfindungsgemässen Zusammensetzungen mittels eines Immunoaffinitätsschritts gereinigt, wobei entweder nur dieser Schritt oder eine Kombination mit weiteren Reinigungsschritten durchgeführt wird. Typischerweise wird ein immobilisierter oder immobilisierbarer anti-hTERT-Antikörper, sowie er von der vorliegenden Erfindung bereitgestellt wird, mit einer Probe, beispielsweise einem Zellysat, das die gewünschte hTERT oder den hTERT-enthaltenden Komplex enthält, unter Bedingungen in Kontakt gebracht, bei denen ein anti-hTERT-Antikörper das hTERT-Antigen bindet. Nach Entfernung von nichtgebundenen Bestandteilen der Probe durch auf dem Fachgebiet allgemein bekannte Verfahren kann die hTERT-Zusammensetzung, falls erwünscht, von dem Antikörper in im wesentlichen reiner Form eluiert werden. In einer Ausführungsform werden auf dem Fachgebiet gut bekannte Immunoaffinitätschromatographieverfahren verwendet (siehe beispielsweise Harlow und Lane, a.a.O., Ausubel, a.a.O., und Hermansanetal., 1992, Immobilized Affinity Ligand Techniques(Academic Press, San Diego) in Übereinstimmung mit den erfindungsgemässen Verfahren. In einer weiteren veranschaulichenden Ausführungsform wird eine Immunpräzipitation von anti-hTERT-Immunglobulin-hTERT-Komplexen unter Verwendung von immobilisiertem Protein A durchgeführt. Dem Fachmann sind zahlreiche Variationen und alternative Immunoaffinitätsreinigungsprotokolle, die zur Verwendung in Übereinstimmung mit den erfindungsgemässen Verfahren und Reagenzien geeignet sind, gut bekannt.

In einer weiteren Ausführungsform können rekombinante hTERT-Proteine als Folge ihrer Expression mit hohem Niveau mittels Routine-Proteinreinigungsverfahren gereinigt werden, beispielsweise durch Ammoniumsulfatpräzipitation, Affinitätssäulen (z.B. Immunoaffinität), Ausschluss nach Grösse («size-exclusion»), Anionen- und Kationen Austauschchromatographie, Gelelektrophorese etc. (siehe allgemein R. Scopes, Protein Purification, Springer-Verlag, N.Y. (1982) und Deutscher, Methods in Enzymology 182: Guide to Protein Purification, Academic Press, Inc. N.Y. (1990)) anstelle von Immunoaffinitätsverfahren oder zusätzlich dazu. Kationenaustauschverfahren können aufgrund des basischen pI-Werts des hTERT-Proteins besonders nützlich sein. Beispielsweise kann immobilisiertes Phosphat als eine funktionelle Kationenaustauschgruppe (z.B. P-11 Phosphocellulose, Whatman-Katalog #4071 oder Cellulosephosphat, Sigma-Katalog #C 3145) verwendet werden. Immobilisiertes Phosphat hat bezüglich der hTERT-Reinigung zwei vorteilhafte Merkmale – es ist ein Kationenaustauschharz und es zeigt physikalisch eine Ähnlichkeit mit dem Phosphatrückgrat von Nucleinsäuren. Daher kann auch die «Pseudo»-Affinitätschromatographie verwendet werden, da hTERT hTR und Telomer-DNA bindet. Andere nicht-spezifische Nucleinsäure-Affinitätschromatographieverfahren sind zur Reinigung ebenfalls von Nutzen (siehe beispielsweise die parallele US-Patentanmeldung mit der Serien-Nr. 08/833 377; Albers et al., Methods Enzymol. 21 (1971), 198; Arnt-Jovin et al., Eur. J. Biochem. 54(1975), 411 und den Pharmacia-Katalog #27-5575-02). Die weitere Nutzung dieser wahrscheinlichen Bindungsfunktion von hTERT würde die Verwendung von spezifischen Nucleinsäuren (z.B. Primer oder hTR) bei Affinitätschromatographie zur Reinigung beinhalten (Chodoroff et al., Mol. Cell. Biol. 6 (1986), 4723; Wu et al., Science 238 (1987), 1247 und Kadonaga, Methods Enzymol. 208 (1991), 10; immobilisierter «Cibricon Blue»-Farbstoff; der physi-



kalisch Nucleotiden ähnelt, stellt aufgrund der hTERT-Bindung von Nucleotiden (z.B. als Substrate für die DNA-Synthese) ein weiteres nützliches Harz für die Reinigung von hTERT dar (Pharmacia-Katalog #17-0948-01 oder Sigma-Katalog #C 1285).

5 In einer Ausführungsform werden hTERT-Proteine direkt von einem in vitro oder in vivo-Expressionssystem isoliert, in dem andere Telomerase-Bestandteile nicht coexprimiert werden. Isoliertes hTERT-Protein kann natürlich auch leicht von gereinigter menschlicher Telomerase oder hTERT-Komplexen beispielsweise durch Aufbrechen des Telomerase-RNPs (z.B. durch Exposition gegenüber einem milden oder einem anderen Denaturierungsmittel) und Abtrennung der RNP-Bestandteile (z.B. durch Routinemassnahmen wie Chromatographie oder Immunoaffinitätschromatographie) gereinigt werden.

10 Die Telomerase-Reinigung kann unter Verwendung eines Assays bezüglich einer Telomerase-Aktivität (z.B. den TRAP-Assay, einen üblichen Assay oder einen Primer-Bindungs-Assay) überwacht werden, durch Bestimmung der hTERT-Anreicherung (z.B. durch ELISA), durch Bestimmung der hTERT-Anreicherung oder durch weitere auf dem Fachgebiet bekannte Verfahren.

15 Die durch die vorliegende Erfindung bereitgestellte gereinigte menschliche Telomerase, die hTERT-Proteine und hTERT-Komplexe, sind in einer Ausführungsform hoch gereinigt (d.h. mindestens zu etwa 90% homogen, vorzugsweise mindestens zu etwa 95% homogen). Die Homogenität kann durch Standardmassnahmen bestimmt werden, beispielsweise durch SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese und andere auf dem Fachgebiet bekannte Mittel (siehe beispielsweise Ausubel et al., a.a.O.). Zwar sind gelegentlich hochgereinigte menschliche Telomerase, hTERT-Protein oder hTERT-Komplexe erwünscht, aber  
20 natürlich sind auch im wesentlichen gereinigte (z.B. mit wenigstens etwa 75% Homogenität) oder partiell gereinigte (z.B. mindestens zu etwa 20% homogen) menschliche Telomerase, hTERT-Protein oder hTERT-Komplexe für viele Anwendungen auch von Nutzen und diese werden durch die vorliegende Erfindung ebenfalls bereitgestellt. Beispielsweise ist partiell gereinigte Telomerase nützlich für das Screenen von Testverbindungen bezüglich einer Telomerase-modulierenden Aktivität und für weitere Verwendungen  
25 (siehe beispielsweise die parallele US-Patentanmeldung mit der Serien-Nr. 08/911312 (Anwalts-Register Nr. 015 389-002 500, eingereicht am 14. August 1997, vorstehend zitiert, und US-Patent-Nr. 5 645 986, USSN 08/151 477, eingereicht am 12. November 1993 und USSN 08/288 501, eingereicht am 10. August 1994).

30 VII. Die Behandlung von Erkrankungen, die mit Telomerase in Verbindung stehen

#### A) Einleitung

Die vorliegende Erfindung stellt hTERT-Polynucleotide, -Polypeptide und -Antikörper bereit, die für die  
35 Behandlung von menschlichen Erkrankungen und Krankheitszuständen von Nutzen sind. Die rekombinanten und synthetischen erfindungsgemässen hTERT-Genprodukte (Protein und mRNA) können dazu verwendet werden, um Telomerase-Aktivität in einer Zelle zu erzeugen oder zu erhöhen, aber auch um Telomerase-Aktivität in einer Zelle zu hemmen, in der dies nicht erwünscht ist. Somit kann die Hemmung, Inaktivierung oder anderweitige Veränderung einer Telomerase-Aktivität (z.B. einer katalytischen  
40 Aktivität von Telomerase, Genauigkeit, Prozessivität, Telomer-Bindung etc.) in einer Zelle zur Veränderung der Proliferationsfähigkeit der Zelle verwendet werden. Beispielsweise kann die Herabsetzung von Telomeraseaktivität in einer immortalisierten Zelle, wie beispielsweise einer malignen Tumorzelle, die Zelle mortalisieren. Umgekehrt kann die Steigerung der Telomeraseaktivität in einer sterblichen Zelle (wozu beispielsweise die meisten menschlichen somatischen Zellen gehören) zur Steigerung der Proliferationsfähigkeit der Zelle führen. Beispielsweise führt die Expression eines hTERT-Proteins in Hautfibroblasten, wodurch die Telomerlänge ansteigt, zu einer erhöhten Proliferationskapazität der Fibroblasten; eine solche Expression kann die altersabhängige Verlangsamung des Wundverschlusses verlangsamen oder umkehren (siehe beispielsweise West, Arch. Derm. 130 (1994), 87).

Somit betrifft ein Aspekt der vorliegenden Erfindung die Bereitstellung von Reagenzien und Verfahren,  
50 ren, die bei der Behandlung von Erkrankungen und Zuständen von Nutzen sind, die durch die Anwesenheit, das Fehlen oder die Menge von menschlicher Telomerase-Aktivität in einer Zelle gekennzeichnet sind und die auf eine Behandlung unter Verwendung der hier beschriebenen Zusammensetzungen und Verfahren ansprechen. Zu diesen Erkrankungen zählen, so wie dies ausführlich und nachstehend beschrieben wird, Krebserkrankungen, andere Erkrankungen bezüglich der Zellproliferation (insbesondere  
55 Erkrankungen bezüglich der Alterung, immunologische Funktionsstörungen, Unfruchtbarkeit (oder Fruchtbarkeit) etc.

#### B) Die Behandlung von Krebs

60 Die vorliegende Erfindung stellt Verfahren und Zusammensetzungen zur Herabsetzung von Telomerase-Aktivität in Tumorzellen und zur Behandlung von Krebs bereit. Krebszellen (z.B. maligne Tumorzellen), die Telomerase-Aktivität exprimieren (Telomerase-positive Zellen) können durch Herabsetzung oder Hemmung der endogenen Telomerase-Aktivität mortalisiert werden. Darüber hinaus könnte jede Herabsetzung der Telomerase-Aktivität die aggressive Natur einer Krebserkrankung hin zu einem leichter zur  
65 therapierenden Krankheitsstatus (durch Steigerung der Wirksamkeit von konventionellen Behandlungs-

methoden) herabsetzen, da Telomerasespiegel mit Krankheitskennzeichen, wie beispielsweise dem Potential zur Metastasenbildung korrelieren (siehe beispielsweise US-Patent Nr. 5 639 613; 5 648 215; 5 489 508 und Pandita et al., Proc. Am. Ass. Cancer Res 37 (1996, 559).

Die Erfindung stellt Zusammensetzungen und Verfahren bereit, die bei der Behandlung einer grossen Anzahl von unterschiedlichen Krebstypen von Nutzen sind, einschliesslich von soliden Tumoren und Leukämien. Zu den Krebsarten, die behandelt werden können gehören (jedoch ohne Beschränkung darauf): das Adenokarzinom der Brust, der Prostata und des Dickdarms; alle Formen von Lungenkrebs, der von den Bronchien ausgeht; Knochenmarkskrebs, das Melanom, das Hepatom, das Neuroblastom; das Papillom; das Apudom, das Choristom, das Branchiom; das maligne Karzinoid-Syndrom; die Karzinoid-Herzerkrankung; das Karzinom (z.B. Walke-Karzinom, Basalzellen-Karzinom, basosquamöses Karzinom, Brown-Pearce-Karzinom, duktales Karzinom, Ehrlich-Tumor, insitu-Karzinom, Krebs-2-Karzinom, Merkel-Zellen-Karzinom, Schleimkrebs, nicht-kleinzelliges Bronchialkarzinom, Haferzellen-Karzinom, papilläres Karzinom, szirröses Karzinom, bronchiolo-alveoläres Karzinom, Bronchial-Karzinom, Plattenepithelkarzinom und Transitionalzell-Karzinom); histiocytische Funktionsstörung; Leukämie (z.B. in Zusammenhang mit B-Zellen-Leukämie, Gemischt-Zellen-Leukämie, Nullzellen-Leukämie, T-Zellen-Leukämie, chronische T-Zellen-Leukämie, HTLV-II-assoziierte Leukämie, akut lymphozytische Leukämie, chronisch-lymphozytische Leukämie, Mastzell-Leukämie und myeloische Leukämie), maligne Histiocytose, Hodgkin-Krankheit, klein Immunproliferativ; non-Hodgkin-Lymphom, solitärer Plasmazelltumor; Reticuloendotheliose, Melanom, Chondroblastom; Chondrom, Chondrosarkom; Fibrom; Fibrosarkom; Riesenzell-Tumor; Histiocytom, Lipom; Liposarkom; Mesotheliom, Myxom; Myxosarkom; Osteom; Osteosarkom; Ewing-Sarkom; Synoviom; Adenofibrom; Adenolymphom; Karcinosarkom, Chordom, Craniopharyngiom, Dysgerminom, Hamartom; Mesenchymom; Mesonephrom, Myosarkom, Ameloblastom, Cementom; Odontom; Teratom; Thymom, Chorioblastom; Adenokarzinom, Adenom; Cholangiom; Cholesteatom; Cylindrom; Cystadenocarcinom, Cystadenom; Granulosazelltumor; Gynandroblastom, Hepatom; Hidradenom; Inselzelltumor; Leydig-Zelltumor; Papillom; Sertoli-Zell-Tumor, Thekazelltumor, Leiomyom; Leiomyosarkom; Myoblastom; Myom; Myosarkom; Rhabdomyom; Rhabdomyosarkom; Ependymom; Ganglioneurom, Gliom; Medulloblastom, Meningiom; Neurilemmom; Neuroblastom; Neuroepitheliom, Neurofibrom, Neurom, Paragangliom, nicht-chromaffines Paragangliom, Angiokeratom, angiolymphoide Hyperplasie mit Eosinophilie; sclerosierendes Angiom; Angiomatose; Glomangiom; Hemangioendotheliom; Hemangiom; Hemangiopericytom, Hemangiosarkom; Lymphangiom, Lymphangiomyom, Lymphangiosarkom; Pinealom; Carcinosarkom; Chondrosarkom; Cystosarkom phyllodes; Fibrosarkom; Hemangiosarkom; Leiomyosarkom; -Leukosarkom; Liposarkom; Lymphangiosarkom; Myosarkom; Myxosarkom, ovarialkarzinom, Rhabdomyosarkom; Sarkom (z.B. Ewing-Sarkom, experimentell, Kaposi-Sarkom und Mastzell-Sarkom); Neoplasmen (z.B. Knochen-Neoplasmen, Brust-Neoplasmen, Neoplasmen des Verdauungssystems, colorektale Neoplasmen, Leber-Neoplasmen, Pankreas Neoplasmen, Hirnanhang-Neoplasmen, Hoden-Neoplasmen, Orbita-Neoplasmen, Neoplasmen des Kopfes und Halses, des Zentralnervensystems, Neoplasmen des Hörorgans, des Beckens, des Atmungstrakts und des Urogenitaltrakts); Neurofibromatose und cervicale Plattenepitheldysplasie). Die Erfindung stellt Zusammensetzungen und Verfahren bereit, die zur Behandlung anderer Zustände von Nutzen sind, bei denen Zellen immortalisiert oder hyperproliferativ wurden, beispielsweise durch Disregulation (z.B. abnormhohe Expression) von hTERT, dem Telomeraseenzym oder Aktivität.

Die vorliegende Erfindung stellt ferner Zusammensetzungen und Verfahren zur Prävention von Krebserkrankungen zur Verfügung, dazu zählen anti-hTERT, Vakzine, Gentherapie-Vektoren, die die Aktivierung von Telomerase verhindern und Gentherapie-Vektoren, die den spezifischen Tod von Telomerase-positiven Zellen zur Folge haben. In einem verwandten Aspekt können die nachstehend beschriebenen Genaustausch-Therapieverfahren zur «Behandlung» einer genetischen Prädisposition für Krebserkrankungen verwendet werden.

#### C) Behandlung anderer Zustände

Die vorliegende Erfindung stellt auch Zusammensetzungen und Verfahren bereit, die zur Behandlung von Erkrankung und Krankheitszuständen (zusätzlich zu Krebserkrankungen) von Nutzen sind, die durch eine unter- oder Überexpression von Telomerase oder hTERT-Genprodukten gekennzeichnet sind. Zu den Beispielen gehören: Erkrankungen bezüglich der Zellproliferation, Erkrankungen, die von Zellseneszenz herrühren (insbesondere Erkrankungen bezüglich des Alterns), immunologische Funktionsstörung und Unfruchtbarkeit, Erkrankungen bezüglich einer Immun-Fehlfunktion etc.

Bestimmte Erkrankungen bezüglich des Alterns sind durch mit der Zellseneszenz-assoziierte Veränderungen aufgrund einer verringerten Telomerlänge (verglichen mit jüngeren Zellen) gekennzeichnet. Diese sind die Folge des Fehlens (oder eines viel geringeren Niveaus) von Telomerase-Aktivität in der Zelle. Eine verringerte Telomerlänge und eine verringerte Replikationsfähigkeit tragen zu den nachstehend beschriebenen Erkrankungen bei. Telomerase-Aktivität und Telomerlänge kann beispielsweise dadurch erhöht werden, dass das Niveau an hTERT-Genprodukten (Protein und mRNA) in der Zelle erhöht wird. Nachstehend wird ein Teil der Krankheitszustände aufgezählt, die mit zellulärer Seneszenz assoziiert sind, bei denen hTERT-Expression eine therapeutische Wirkung zeigen kann: Alzheimer-Erkrankung, Parkinson-Erkrankung, Huntington-Erkrankung und Schlaganfall, mit dem Alter in Zusammenhang ste-

hende Erkrankungen des Integuments, beispielsweise Hautatrophie, Elastolyse und Faltenbildung der Haut, Talgdrüsenhyperplasie, Bildung von Altersflecken, das Ergrauen der Haare und der Haarausfall, chronische Hautgeschwüre, und mit der Alterung in Zusammenhang stehende Verschlechterung der Wundheilung; degenerative Gelenkerkrankungen, Osteoporose; mit der Alterung in Zusammenhang stehende Schwächung des Immunsystems (wobei beispielsweise Zellen beteiligt sind, wie B- und T-Lymphocyten, Monocyten, Neutrophile, Eosinophile, Basophile, NK-Zellen und ihre entsprechenden Vorläufer); mit der Alterung in Zusammenhang stehende Erkrankungen des vaskulären Systems, dazu zählen Atherosclerose, Verkalkung, Thrombose und Aneurysmen; Diabetes, Muskelatrophie; Atemwegserkrankungen, Erkrankungen der Leber und des Darm-Verdauungstrakts, Stoffwechselkrankheiten, endokrine Krankheiten (z.B. Funktionsstörungen der Hirnanhangdrüse und Nebennieren), reproduktive Erkrankungen und mit der Alterung in Zusammenhang stehende Makuladegeneration. Diese Krankheiten und Zustände können dadurch behandelt werden, dass das Niveau an hTERT-Genprodukten in der Zelle erhöht wird, um dadurch die Telomerlänge zu erhöhen, wobei die Replikationsfähigkeit der Zelle wiederhergestellt oder erhöht wird. Solche Verfahren können ex vivo an kultivierten Zellen oder in vivo an Zellen ausgeführt werden. In einer Ausführungsform werden die Zellen zuerst zur Aktivierung von Telomerase und Verlängerung der Telomere behandelt und danach erfolgt eine Behandlung zur Inaktivierung des hTERT-Gens und von Telomerase-Aktivität.

In einer bevorzugten Ausführungsform wird Telomerase-Aktivität durch einen erfindungsgemässen Vektor in einer embryonalen Keimzelle oder Stammzelle erzeugt (siehe USSN 08/591 246, eingereicht am 13. Januar 1996; USSN 08/376 327, eingereicht am 20. Januar 1995; Pederson et al.; USSN 08/665 217, eingereicht am 14. Juni 1996 und USSN 08/829 372, eingereicht am 31. März 1997) vor oder während der Differenzierung.

Die vorliegende Erfindung stellt auch Verfahren und Zusammensetzungen bereit, die zur Behandlung von Unfruchtbarkeit von Nutzen sind. Menschliche Keimbahnzellen (z.B. Stammsamenzellen, ihre Vorläufer oder Abkömmlinge) können unbegrenzt proliferieren und sind durch eine hohe Telomerase-Aktivität gekennzeichnet. Abnormale oder verringerte Konzentrationen von hTERT-Genprodukten können beispielsweise dazu führen, dass es zu einer unzulänglichen oder abnormalen Produktion von Spermatozoen kommt, was zu Unfruchtbarkeit oder Funktionsstörungen bei der Reproduktion führt. Somit kann eine auf «Telomerase basierende» Unfruchtbarkeit unter Verwendung der hier beschriebenen Verfahren und Zusammensetzung zur Erhöhung der Telomerase-Konzentrationen behandelt werden. Da die Hemmung von Telomerase die Spermatogenese, Oogenese sowie die Lebensfähigkeit von Sperma und Eiern negativ beeinflussen kann, können die erfindungsgemässen Telomerase-hemmenden Zusammensetzungen empfängnisverhütende Wirkungen haben, wenn sie in Keimbahnzellen zur Herabsetzung der Konzentrationen von hTERT-Genprodukten verwendet werden.

Die Erfindung stellt ferner Verfahren und Zusammensetzungen zur Verfügung, die zur Verringerung des proliferativen Potentials von Telomerase-positiven Zellen durch Herabsetzung der Telomerase-Aktivität verwendet werden kann, beispielsweise bei aktivierten Lymphocyten und hematopoietischen Stammzellen. Somit stellt die Erfindung Mittel für die Bewirkung einer Immunsuppression bereit. Umgekehrt sind die erfindungsgemässen Verfahren und Reagenzien von Nutzen zur Steigerung der Telomerase-Aktivität und des proliferativen Potentials in Zellen, wie beispielsweise Stammzellen, die vor dem therapeutischen Eingriff einen niedrigen Telomerase-Spiegel oder keine Telomerase exprimieren.

#### D) Arten der Intervention

Aufgrund der vorstehenden Diskussion ist es klar, dass die Modulation des Telomerase-Spiegels oder der Telomerase-Aktivität einer Zelle eine ausgeprägte Auswirkung auf das proliferative Potential der Zelle haben kann und somit bei der Behandlung einer Erkrankung von grossem Nutzen ist. Es ist ebenfalls klar, dass diese Modulation entweder durch eine Verringerung von Telomerase-Aktivität oder eine Aktivitätssteigerung erfolgen kann. Die Telomerase modulierenden erfindungsgemässen Moleküle können durch eine Reihe von Mechanismen wirken; einige dieser Mechanismen werden in dieser und den nachstehenden Unterabschnitten beschrieben, um so dem Anwender bei der Auswahl therapeutischer Mittel zu helfen. Die Anwender beabsichtigen jedoch bezüglich der hier beschriebenen neuen Arzneimittel, Zusammensetzungen und Verfahren keiner Beschränkung auf einen bestimmten Wirkungsmechanismus.

Telomerase-Aktivität kann durch verschiedene Mechanismen oder Kombinationen von Mechanismen verringert werden. Ein Mechanismus ist die Herabsetzung der hTERT-Genexpression zur Herabsetzung von Telomerase-Aktivität. Diese Herabsetzung kann auf dem Stadium der Transkription des hTERT-Gens in mRNA stattfinden, bei der Prozessierung (z.B. dem Spleissen), beim nucleären Transport oder hinsichtlich der Stabilität von mRNA, bei der Translation von mRNA zur Herstellung von hTERT-Protein oder hinsichtlich der Stabilität und Funktion von hTERT-Protein. Ein weiterer Mechanismus bezieht sich auf Störung einer oder mehrerer Telomerase-Aktivitäten, (z.B. die katalytische Aktivität von reverser Transkriptase oder der hTERT-Bindungs-Aktivität) durch Verwendung hemmender Nucleinsäuren, Polypeptiden, oder anderer Agenzien (z.B. imitierende Agenzien («mimetics»), kleine Moleküle, Medikamente und Medikamentenvorstufen («pro-drugs»)), die unter Verwendung der hier beschriebenen Verfahren identifiziert werden können oder durch die hier beschriebenen Zusammensetzungen bereitgestellt werden. Zu weite-

ren Mechanismen zählen die Sequestrierung von hTR und/oder Telomerase-assoziierten Proteinen und die Störung der Assemblierungen des Telomerase-RNPs aus den Bestandteilen der Unterinheiten. Bei einem verwandten Mechanismus wird eine hTRT-Promotorsequenz mit einem Gen funktionell verknüpft, das ein Toxin codiert, und dieses Konstrukt in eine Zelle eingeführt. Falls oder dann, wenn transkriptionelle Aktivatoren für hTRT in der Zelle exprimiert oder aktiviert werden, wird das Toxin exprimiert, was zu einer spezifischen Abtötung der Zelle führt.

Ein verwandtes Verfahren zur Herabsetzung der Proliferationsfähigkeit einer Zelle beinhaltet die Einführung einer hTRT-Variante mit geringer Genauigkeit, d.h. einer Variante mit einer hohen Fehlerrate, beispielsweise über 1%, so dass abweichende Telomer-Wiederholungseinheiten synthetisiert werden. Diese abweichenden Wiederholungseinheiten wirken sich auf die Telomer-Proteinbindung aus und führen zu chromosomalen Rearrangements und Anomalien und/oder führen zum Tod der Zelle.

Auf ähnliche Weise kann die Telomerase-Aktivität durch verschiedene Mechanismen oder eine Kombination von Mechanismen gesteigert werden. Zu diesen gehören die Steigerung der Menge von hTRT in einer Zelle. Üblicherweise wird dies durch Einführung eines ein hTRT-Polypeptid codierenden Polynucleotids in die Zelle erreicht (z.B. mittels eines rekombinant hergestellten Polypeptids, das eine mit einem Promotor funktionell verknüpfte hTRT-DNA-Sequenz umfasst oder eine stabile hTRT-mRNA). In einer alternativen Ausführungsform kann ein katalytisch aktives hTRT-Polypeptid selbst in eine Zelle oder ein Gewebe, beispielsweise durch Mikroinjektion oder andere auf dem Fachgebiet bekannte Massnahmen eingeschleust werden. Bei anderen Mechanismen kann die Expression des endogenen hTRT-Gens oder die Stabilität von hTRT-Genprodukten in der Zelle gesteigert werden. Telomerase-Aktivität in einer Zelle kann auch durch Störung der Interaktion von endogenen Telomeraseninhibitoren und dem Telomerase-RNP oder von endogenen Repressoren der hTRT-Transkription und dem hTRT-Gen gesteigert werden, darüber hinaus durch Steigerung der Expression oder Aktivität von Aktivatoren der hTRT-Transkription sowie weitere Massnahmen, die für den Fachmann nach Lesen dieser Beschreibung offensichtlich sind.

#### E) Mittel für die Intervention

##### 1) TRT-Proteine und Peptide

In einer Ausführungsform stellt die Erfindung Telomerasemodulierende Polypeptide (d.h. Proteine, Polypeptide und Peptide) bereit, die Telomerase-Aktivität steigern oder herabsetzen. Diese können in eine Zielzelle direkt (z.B. durch Injektion, Liposomen-vermittelte Fusion, Applikation eines Hydrogels auf die Tumoroberfläche (z.B. bei einem Melanom, Fusion oder Anheftung des Strukturproteins VP22 des Herpes-Virus und weitere hier beschriebene und auf dem Fachgebiet bekannte Verfahren) eingeführt werden. In einer zweiten Ausführungsform werden erfindungsgemässe Telomerasemodulierenden Proteine und Peptide in einer Zelle durch Einführung einer Nucleinsäure (z.B. eines DNA-Expressionsvektors oder mRNA), die das gewünschte Protein oder Peptid in der Zelle codiert, in einer Zelle exprimiert. Die Expression kann entweder konstitutiv oder induzierbar sein, was von dem Vektor und der Wahl des Promotors (siehe die nachstehende Diskussion) abhängt. Präparationen von Messenger-RNA, die hTRT codieren, sind besonders dann von Nutzen, wenn lediglich eine transiente Expression (z.B. die transiente Aktivierung von Telomerase) erwünscht ist. Verfahren zur Einführung und Expression von Nucleinsäuren in eine Zelle sind auf dem Fachgebiet allgemein bekannt (siehe darüber hinaus andere Stellen in dieser Beschreibung, beispielsweise die Abschnitte über Oligonucleotide und Gentherapieverfahren).

Ein Aspekt dieser Erfindung betrifft ein Telomerasemodulierendes Polypeptid, das Telomerase-Aktivität in einer Zelle erhöht. In einer Ausführungsform ist das Polypeptid ein katalytisch aktives hTRT-Polypeptid, das die Synthese von menschlicher Telomer-DNA (in Verbindung mit einer RNA-Matrize, wie beispielsweise hTR) steuern kann. Diese Aktivität kann wie vorstehend diskutiert gemessen werden, beispielsweise unter Verwendung eines Telomerase-Aktivitätsassays, wie beispielsweise einem TRAP-Assay. In einer Ausführungsform ist das Polypeptid ein hTRT-Protein mit vollständiger Länge und einer Sequenz, die der Sequenz von 1132 Resten von SEQ. ID. Nr. 2 entspricht oder im wesentlichen identisch dazu ist. In einer weiteren Ausführungsform ist das Polypeptid eine Variante des hTRT-Proteins von SEQ. ID. Nr. 2, beispielsweise ein Fusionspolypeptid, derivatisiertes Polypeptid, verkürztes Polypeptid, Polypeptid mit konservativen Substitutionen etc. Ein Fusions- oder derivatisiertes Protein kann eine «targeting»-Einheit enthalten, die die Fähigkeit des Polypeptids die Zellmembran zu durchdringen steigert, oder bewirkt, dass das Polypeptid einem spezifischen Zelltyp (z.B. Leberzellen oder Tumorzellen) oder Zellkompartimenten (z.B. dem nucleären Kompartiment) bevorzugt zugeführt wird. Zu den Beispielen für solche «Zielsetzungs»-Einheiten gehören Lipidschwänze, Aminosäuresequenzen, wie beispielsweise das «antennapediall-Peptid (siehe USSN 08/838,545, eingereicht am 9. April 1997) oder ein nucleäres Lokalisationssignal (NLS; z.B. Xenopus-Nucleoplasmin; Robbins et al., Cell 64 (1991), 615). Natürlich vorkommendes hTRT-Protein (z.B. mit einer Sequenz, die SEQ. ID. Nr. 2 entspricht oder dazu im wesentlichen identisch ist) wirkt im Zellnucleus. Daher ist es wahrscheinlich, dass eine oder mehrere Untersequenzen von SEQ. ID. Nr. 2, beispielsweise die Reste 193 bis 196 (PRRR) und die Reste 235–240 (PKRPRR) als nucleäres Lokalisationssignal wirken. Die kleinen Bereiche sind wahrscheinlich NLSs. Dies beruht auf der Beobachtung, dass viele NLSs ein Muster mit vier Resten umfassen, das

aus basischen Aminosäuren (K oder R) oder drei basischen Aminosäuren (K oder R) und H oder P zusammengesetzt ist; einem Muster, das mit P beginnt, woran sich innerhalb dreier Reste ein basisches Segment anschliesst, das 3 K- oder R-Reste von vier Resten enthält (siehe beispielsweise Nakai et al., Genomics 14 (1992) 897). Es wird davon ausgegangen, dass die Deletion inner dieser sequenzen oder beider und/oder zusätzlicher Lokalisationssequenzen den hTERT-Transport in den Nucleus stört und/oder den hTERT-Umsatz steigert und somit zur Verhinderung des Zugangs von Telomerase zu seinen nucleären Substraten der Herabsetzung des proliferativen Potentials von Nutzen ist. Darüber hinaus könnte eine hTERT-Variante, der das NLS fehlt, sich zu einem RNP assemblieren, das nicht mehr die Telomerlänge aufrechterhalten kann, da das daraus hervorgehende Enzym nicht in den Nucleus hineingelangen kann.

Die erfindungsgemässen hTERT-Polypeptide sind typischerweise in der Zielzelle mit einer Telomerase-RNA, wie beispielsweise hTR, assoziiert, wenn sie zur Steigerung von Telomerase-Aktivität in einer Zelle verwendet werden. In einer Ausführungsform assoziiert ein eingeführtes hTERT-Polypeptid mit einer endogenen hTR zur Bildung eines katalytisch aktiven RNP (z.B. eines RNPs, das die hTR und ein Polypeptid mit vollständiger Länge und einer Sequenz von SEQ. ID. Nr. 2 umfasst). Das so gebildete RNP kann auch mit weiteren, beispielsweise Telomerase-assoziierten, Proteinen assoziieren. In weiteren Ausführungsformen wird das Telomerase-RNP (das hTERT-Protein, hTR und gegebenenfalls weitere Bestandteile enthält) als Komplex in die Zielzelle eingeführt.

In einer ähnlichen Ausführungsform wird ein hTERT- Expressionsvektor in eine Zelle (oder die Nachkommenschaft einer Zelle) eingeführt, in die ein Telomerase-RNA (z.B. hTR)-Expressionsvektor gleichzeitig, danach oder vorher eingeführt wird. In dieser Ausführungsform werden hTERT-Protein und Telomerase-RNA in der Zelle coexprimiert und sie assemblieren zur Bildung eines Telomerase-RNPs. Eine bevorzugte Telomerase-RNA ist hTR zusammen. Ein für die Expression von hTR in einer Zelle nützlicher Expressionsvektor wurde vorstehend beschrieben (siehe US-Patent 5 583 016). In einer weiteren Ausführungsform sind das hTERT-Polypeptid und die hTR-RNA (oder ein Äquivalent) zur Bildung eines Komplexes, der dann in die Zielzellen eingeführt wird, in vitro assoziiert. Ein weiterer Aspekt der Erfindung betrifft die Bereitstellung von hTERT-Polypeptiden, die zur Herabsetzung der Telomerase-Aktivität in einer Zelle nützlich sind.

Wie vorstehend beschrieben, können diese «hemmenden» Polypeptide entweder direkt in die Zelle eingeführt werden oder durch Expression von rekombinanten Nucleinsäuren in der Zelle erzeugt werden. Peptid-«Imitatoren» oder Polypeptide, die Nicht-Standard-Aminosäuren umfassen (d.h. Aminosäuren, die nicht den durch den genetischen Code codierten 20 Aminosäuren oder deren normalen Derivaten entsprechen) werden normalerweise direkt eingeführt.

In einer Ausführungsform führt die Hemmung der Telomerase-Aktivität zu der Sequestrierung eines Bestandteils, der für die genaue Telomerverlängerung erforderlich ist. Beispiele für solche Bestandteile sind hTERT und hTR. Somit kann die Verabreichung eines Polypeptids, das hTR bindet, jedoch keine katalytische Aktivität von Telomerase aufweist, die endogene Telomerase-Aktivität in der Zelle herabsetzen. In einer verwandten Ausführungsform kann das hTERT-Polypeptid einen Zellbestandteil binden, bei dem es sich nicht um hTR handelt, beispielsweise ein Telomerase-assoziiertes Protein (oder mehrere), wodurch die Telomerase-Aktivität in der Zelle gestört wird.

In einer anderen Ausführungsform stören die erfindungsgemässen hTERT-Polypeptide die Interaktion von endogen exprimiertem hTERT-Protein und einer anderen für die Telomerase-Funktion erforderlichen zellulären Komponente, beispielsweise hTR, Telomer-DNA, Telomerase-assoziierte Proteine, Telomerase-assoziierte Proteine, Telomere, den Zellcyclus kontrollierende Proteine, DNA-Reparaturenzyme, Histone oder nicht-Histon-chromosomale Proteine etc. (beispielsweise durch Konkurrenz).

Durch Auswahl von erfindungsgemässen Molekülen (Z.B. Polypeptiden), die sich auf die Interaktion von endogen exprimiertem hTERT-Protein und weiteren zellulären Bestandteilen auswirken, kann man Moleküle bevorzugen, die, wie hier beschrieben, eines oder mehrere der konservierten Motive des hTERT-Proteins enthalten. Die evolutionäre Konservierung dieser Bereiche zeigt, dass diese Motive eine wichtige Funktion in dem korrekten Arbeiten der menschlichen Telomerase beisteuern. Diese Motive sind somit allgemein nützliche Bereiche, um die Funktion des hTERT-Proteins zur Erzeugung von erfindungsgemässen hTERT-Proteinvarianten zu verwenden. somit sind hTERT-Polypeptidvarianten mit Mutationen in konservierten Motiven von besonderem Nutzen.

In einer weiteren Ausführungsform wird die Expression des endogenen hTERT-Gens durch Einführung einer grossen Menge an hTERT-Polypeptid in die Zelle (z.B. typischerweise mindestens etwa mehr als 2fach im Vergleich zu dem endogenen Spiegel, vorzugsweise etwa mindestens 10- bis etwa 100fach) reprimiert. Dieses wirkt über eine Prüfkopplungsschleife und hemmt so die Transkription des hTERT-Gens, die Prozessierung der hTERT-prä-m-PNA, die Translation der hTERT-mRNA oder die Assemblierung und den Transport des Telomerase-RNPs.

## 2) Oligonucleotide

## a) «Antisense»-Konstrukte

Die Erfindung stellt Verfahren und «antisense»-Oligonucleotide oder Polynucleotidreagenzien zur Verfügung, die zur Herabsetzung der Expression von hTERT-Genprodukten in vitro oder in vivo verwendet werden können. Die Verabreichung der erfindungsgemässen «antisense»-Reagenzien an eine Zielzelle führt zu einer herabgesetzten Telomerase-Aktivität und ist für die Behandlung von Erkrankungen besonders nützlich, die durch eine hohe Telomerase-Aktivität gekennzeichnet sind (z.B. bei Krebserkrankungen). Es wird davon ausgegangen, wobei hier keine Einschränkung auf einen bestimmten Mechanismus beabsichtigt ist, dass «antisense»-Oligonucleotide an die «sense»-hTERT-mRNA binden und deren Translation stören. Alternativ können die «antisense»-Moleküle die hTERT-mRNA für eine Spaltung mit Nuclease empfindlich machen, die Transkription, Prozessierung oder Lokalisierung stören oder auf andere Weise RNA-Vorläufer («prä-mRNA») stören, die Transkription von mRNA des hTERT-Gens reprimieren oder über einige andere Mechanismen wirken. Der bestimmte Mechanismus, durch den die «antisense»-Moleküle die hTERT-Expression herabsetzen, ist jedoch nicht kritisch.

Die erfindungsgemässen «antisense»-Polynucleotide umfassen eine «antisense»-Sequenz mit mindestens 7 bis 10 oder mehr Nucleotiden, die mit einer Sequenz von mRNA, die humane TRT codiert, oder mRNA, die von dem hTERT-Gen transkribiert wird, spezifisch hybridisieren. Vorzugsweise weist das erfindungsgemässe «antisense»-Polynucleotid eine Länge von etwa 10 bis etwa 50 Nucleotiden oder von etwa 14 bis etwa 35 Nucleotiden auf. In weiteren Ausführungsformen handelt es sich bei den «antisense»-Polynucleotiden um Polynucleotide, die kürzer als etwa 100 Nucleotide oder kürzer als etwa 200 Nucleotide sind. Im allgemeinen sollten die «antisense»-Polynucleotide lang genug sein, um eine stabile Doppelhelix zu bilden, jedoch kurz genug (in Abhängigkeit von der Art der Zuführung) um, falls erwünscht, in vivo verabreicht werden zu können. Die minimale Länge eines Polynucleotids, die für eine spezifische Hybridisierung mit einer Zielsequenz erforderlich ist, hängt von verschiedenen Faktoren ab, beispielsweise vom G/C-Gehalt, der Lage von fehlgepaarten Basen (falls vorhanden), dem Ausmass der Einzigartigkeit der Sequenz im Vergleich zu der Population von Ziel-Polynucleotiden, der chemischen Natur des Polynucleotids (z.B. kann es sich um ein Methylphosphonat-Rückgrat handeln, eine Peptid-Nucleinsäure, ein Phosphorothioat) etc. Im allgemeinen ist die «antisense»-Sequenz zur Gewährleistung einer spezifischen Hybridisierung zu der Ziel-hTERT-mRNA-Sequenz im wesentlichen komplementär. In bestimmten Ausführungsformen ist die «antisense»-Sequenz genau komplementär zu der Zielsequenz. Die «antisense»-Polynucleotide können jedoch auch Nucleotid-Substitutionen, Additionen, Deletionen, Transitionen, Transpositionen oder Modifikationen enthalten, solange die spezifische Bindung an die relevante Zielsequenz, die hTERT-RNA oder deren Gen entspricht, als eine funktionelle Eigenschaft des Polynucleotids beibehalten wird.

In einer Ausführungsform ist die «antisense»-Sequenz zu relativ zugänglichen Sequenzen der hTERT-mRNA (z.B. Sequenzen, die relativ wenig Sekundärstrukturen aufweisen) komplementär. Dies kann durch Analyse der vorhergesagten RNA-Sekundärstrukturen bestimmt werden, beispielsweise mittels des MFOLD-Programms (Genetics Computer Group, Madison WI) und durch auf dem Fachgebiet bekannte in vitro- oder in vivo-Tests. Beispiele für Oligonucleotide, die hinsichtlich einer «antisense»-Suppression der hTERT-Funktion getestet werden können, sind Oligonucleotide, die mit den folgenden Positionen von SEQ. ID. Nr. 1 hybridisieren können (d.h. im wesentlichen komplementär sind): SEQ. ID. Nr. 1: 40-60; 260-280; 500-520; 770-790, 885-905; 1000-1020; 1300-1320; 1520-1540; 2110-2130; 2295-2315; 2450-2470, 2670-2690; 3080-3110; 3140-3160; und 3690-3710. Bei einem weiteren nützlichen Verfahren zur Identifizierung von effektiven «antisense»-Zusammensetzungen werden kombinatorische Arrays von Oligonucleotiden verwendet (siehe beispielsweise Milner et al., Nature Biotechnology 15 (1997), 537).

Die Erfindung stellt auch ein «antisense»-Polynucleotid bereit, das Sequenzen zusätzlich zu der «antisense»-Sequenz aufweist (z.B. zusätzlich zu der anti-hTERT-«sense»-Sequenz). In diesem Fall ist die «antisense»-Sequenz in einem Polynucleotid mit einer längeren Sequenz enthalten. In einer weiteren Ausführungsform besteht die Sequenz des Polynucleotids im wesentlichen aus der «antisense»-Sequenz oder sie stellt diese dar.

Die «antisense»-Nucleinsäuren (DNA, RNA, modifizierte DNA oder RNA-Analoga etc.) können unter Verwendung jedes zur Herstellung von Nucleinsäuren geeigneten Verfahrens, beispielsweise den hier beschriebenen Verfahren, hergestellt werden. In einer Ausführungsform können erfindungsgemässe «antisense»-RNA-Moleküle beispielsweise durch chemische Synthese de novo oder durch Clonierung hergestellt werden. Beispielsweise kann eine «antisense»-RNA, die mit hTERT-mRNA hybridisiert, dadurch hergestellt werden, dass eine hTERT-DNA-Sequenz (z.B. SEQ. ID. Nr. 1 oder ein Fragment davon) in umgekehrter Orientierung funktionell mit einem Promotor verknüpft in einen Vektor (z.B. ein Plasmid) inseriert (ligiert) wird. Unter der Voraussetzung, dass der Promotor und vorzugsweise Terminations- und Polyadenylierungssignale korrekt positioniert sind, wird der Strang der inserierten Sequenz, der dem nicht-codierenden Strang entspricht, transkribiert, und dieser wirkt als ein erfindungsgemässes «antisense»-Oligonucleotid.

Die erfindungsgemässen «antisense»-Oligonucleotide können zur Hemmung der Telomerase-Aktivität

in zellfreien Extrakten, Zellen und Tieren, einschliesslich Säugern und Menschen, verwendet werden. Die Phosphorothioat-«antisense»-Oligonucleotide:

- 5  
A) GGCATCGCGGGGGTGGCCGGG  
B) CAGCGGGGAGCGCGCGGCATC  
C) CAGCACCTCGCGGTAGTGGCT  
D) GGACACCTGGCGGAAGGAGG

10 können beispielsweise zur Hemmung von Telomerase-Aktivität verwendet werden. Bei einer Konzentration von 10 µM hemmte(n) jedes Oligonucleotid; Gemische der Oligonucleotide A und B; A, B, C und D; und A, C und D die Telomerase Aktivität in 293-Zellen, wenn diese 7 Tage einmal pro Tag behandelt wurden. Eine Hemmung wurde auch mit einem «antisense»-hTR-Molekül (5'-GCTCTAGAATGAAGGGTG-3') beobachtet, wenn dies mit den Oligonucleotiden A, B und C; A, B und D; und A und C kombiniert war. Zu den für solche Experimente nützlichen Kontroll- und Oligonucleotiden zählen:

- 20  
S1) GCGACGACTGACATTGGCCGG  
S2) GGCTCGAAGTAGCACC GGTC  
S3) GTGGGAACAGGCCGATGTCCC

25 Um für die für eine bestimmte gewünschte Anwendung optimalen erfindungsgemässen «antisense»-Oligonucleotide bestimmen zu können, kann man ein Scanning unter Verwendung eines Satzes von erfindungsgemässen «antisense»-Oligonucleotiden durchführen. Ein Beispiel für einen solchen Satz ist der Satz von 30-mer Oligonucleotiden, die die hTERT-mRNA umspannen und wobei eines von dem nächsten um 15 Nucleotide versetzt ist, (d.h. ON1 entspricht den Positionen 1-30 und ist  
30 TCCCACGTGCGCAGCAGGACGCAGCGCTGC, ON2 entspricht Positionen 16-45 und ist GCCGGGGCCAGGGCTTCCCACGTGCGCAGC, und ON3 entspricht den Positionen 31-60 und ist GGCATCGCGGGGGTGGCCGGGGCCAGGGCT usw. bis zum Ende der mRNA). Jedes Mitglied dieses Satzes kann hinsichtlich seiner hemmenden Aktivität, wie hier beschrieben, getestet werden. Jene Oligonucleotide, die unter den gewünschten Bedingungen eine hemmende Aktivität zeigen, kennzeichnen dann einen gewünschten Bereich. Weitere erfindungsgemässe Oligonucleotide, die dem gewünschten Bereich entsprechen (d.h. 8-mere, 10-mere, 15-mere etc.) können zur Identifikation des Oligonucleotids mit der für die Anwendung bevorzugten Aktivität getestet werden.

35 Bezüglich allgemeiner Verfahren, die sich auf antisense-Polynucleotide beziehen, siehe Antisense RNA and DNA (1988), D.A. Melton, (Herausg., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.) und Dagle et al., Nucleic Acids Research 19 (1991), 1805. Bezüglich eines Übersichtsartikels der die «antisense»-Therapie betrifft, siehe beispielsweise Uhlmann et al., Chem. Reviews 90 (1990) 543-584.

#### b) Triplex-Oligo- und Polynucleotide

45 Die vorliegende Erfindung stellt Oligo- und Polynucleotide (z.B. DNA, RNA oder PNA) bereit, die an doppelsträngige oder Duplex-hTERT-Nucleinsäuren binden, (z.B. in einem gefalteten Bereich der hTERT-RNA oder im hTERT-Gen), wobei eine Nucleinsäure gebildet wird, die eine Dreifach-Helix enthält oder eine «triplex»-Nucleinsäure. Die Bildung einer Dreifach-Helix führt zur Hemmung der hTERT-Expression, beispielsweise durch die Verhinderung der Transkription des hTERT-Gens, wodurch Telomerase-Aktivität  
50 in einer Zelle herabgesetzt oder eliminiert wird. Es wird davon ausgegangen (wobei jedoch nicht beabsichtigt ist, an einen bestimmten Mechanismus gebunden zu sein), dass die Dreifach-Helixpaarung die Fähigkeit der Doppelhelix sich für die Bindung von Polymerasen, Transkriptionsfaktoren oder regulatorischen Molekülen ausreichend zu öffnen, stört.

55 Erfindungsgemässe Triplex-Oligo- und Polynucleotide werden unter Anwendung der Basenpaarungsregeln für die Bildung von Dreifach-Helices konstruiert (siehe beispielsweise Cheng et al., i. Biol. Chem. 263 (1988), 15110; Ferrin und Camerini Otero, Science 354 (1991), 1494; Ramdas et al., J.Biol. Chem. 264 (1989), 17395; Strobel et al., Science 254 (1991), 1639 und Rigas et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83 (1986), 9591, wobei durch Bezugnahme jedes dieser Dokumente als Bestandteil dieser Beschreibung anzusehen ist) und den hTERT-mRNA- und/oder Gensequenzen. Typischerweise umfassen  
60 die erfindungsgemässen Triplex-formenden Oligonucleotide eine spezifische Sequenz von etwa 10 bis mindestens etwa 25 Nucleotiden oder eine längere Sequenz, die zu einer spezifischen Sequenz in der hTERT-RNA oder dem Gen «komplementär» ist (d.h. lang genug, um eine stabile Dreifach-Helix bilden zu können, jedoch kurz genug, in Abhängigkeit von der Art der Zulieferung, um, falls gewünscht, in vivo verabreicht werden zu können). In diesem Zusammenhang bedeutet «komplementär» die Fähigkeit zur  
65



Bildung einer stabilen Dreifach-Helix. In einer Ausführungsform werden Oligonucleotide so entworfen, dass sie spezifisch an die regulatorischen Bereiche des hTERT-Gens (z.B. die hTERT-5'-flankierende Sequenz, Promotoren und Enhancer) oder die Transkriptions-Initiationsstelle (z.B. zwischen -10 und +10 von der Transkriptionsinitiationsstelle) spezifisch binden. Bezüglich eines Übersichtsartikels neuerer therapeutischer Fortschritte, bei denen Triplex-DNA verwendet wird, siehe Gee et al. in Huber und Carr, 1994, Molecular and Immunologic Approaches, Futura Publishing Co., Mt. Kisco NY und Rininsland et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94 (1997), 5854, wobei beide Dokumente durch Bezugnahme als Bestandteil dieser Beschreibung anzusehen sind.

#### 10 c) Ribozyme

Die vorliegende Erfindung stellt auch Ribozyme bereit, die zur Hemmung von Telomerase-Aktivität von Nutzen sind. Die erfindungsgemässen Ribozyme binden, spalten spezifisch und inaktivieren hTERT-mRNA. Nützliche Ribozyme können 5'- und 3'-terminale Sequenzen umfassen, die zu der hTERT-mRNA komplementär sind, und diese können vom Fachmann auf der Basis der hier beschriebenen hTERT-mRNA-Sequenz konstruiert werden (siehe PCT-Veröffentlichung WO 93/23 572, a.a.O.). Zu den erfindungsgemässen Ribozymen gehören Ribozyme mit den Merkmalen der Gruppe I-Intron-Ribozyme (Cech, Biotechnology 13 (1995), 323) und «hammerhead»-Ribozyme (Eggington, Biotechnology 10 (1992), 256).

Zu den erfindungsgemässen Ribozymen zählen Ribozyme mit Spaltstellen wie GUA, GUU und GUC. Zu weiteren optimalen Spaltstellen für die Ribozym-vermittelte Hemmung von Telomerase-Aktivität gemäss der vorliegenden Erfindung gehören jene, die in den PCT-Veröffentlichungen WO 94/02 595 und WO 93/23 569 beschrieben sind, wobei beide Dokumente durch Bezugnahme als Bestandteil dieser Beschreibung anzusehen sind. Kurze RNA-Oligonucleotide mit einer Länge von 15 und 20 Ribonucleotiden, die einem Bereich des Ziel-hTERT-Gens entsprechen, der eine Spaltstelle enthält, können bezüglich Sekundärstrukturmerkmalen, die zu wünschenswerteren Oligonucleotiden führen, bewertet werden. Die Eignung der Spaltstellen kann auch durch Testen der Zugänglichkeit zur Hybridisierung mit komplementären Oligonucleotiden bewertet werden, wobei «Ribonuclease-Protection»-Assays angewandt werden, oder indem die Ribozym-Aktivität in vitro gemäss auf dem Fachgebiet bekannter Standardverfahren getestet wird.

Wie von Hu et al., PCT-Veröffentlichung WO 94/03 596 beschrieben, können «antisense»- und Ribozym-Funktionen in einem einzigen Oligonucleotid kombiniert werden. Dieses Dokument ist hier ebenfalls durch Bezugnahme als Gegenstand dieser Beschreibung anzusehen. Darüber hinaus können Ribozyme eine oder mehrere modifizierte Nucleotide oder modifizierte Bindungen zwischen Nucleotiden umfassen, wie dies vorstehend im Zusammenhang mit der Beschreibung von veranschaulichenden erfindungsgemässen Oligonucleotiden beschrieben ist.

In einer Ausführungsform werden die erfindungsgemässen Ribozyme in vitro erzeugt und in eine Zelle oder einen Patienten eingeführt. In einer anderen Ausführungsform werden Gentherapieverfahren zur Expression von Ribozymen in einer Zielzelle ex vivo oder in vivo angewandt.

#### 40 d) Verabreichung von Oligonucleotiden

Typischerweise gehört zu den erfindungsgemässen therapeutischen Verfahren die Verabreichung eines Oligonucleotids das so wirkt, dass es unter physiologischen Bedingungen in vivo Telomerase-Aktivität hemmen oder stimulieren kann und das unter diesen Bedingungen für einen Zeitraum, der für eine therapeutische Wirkung ausreicht, relativ stabil ist. Wie bereits vorstehend angegeben, können modifizierte Nucleinsäuren bei der Verleihung einer solchen Stabilität von Nutzen sein, aber auch für die gezielte Zulieferung des Oligonucleotids an das gewünschte Gewebe, Organ oder die gewünschte Zelle.

Oligo- und Polynucleotide können direkt als Arzneimittel in einer geeigneten pharmazeutischen Formulierung zugeliefert werden, oder indirekt durch Mittel zur Einführung einer Nucleinsäure in eine Zelle, wozu Liposome, Immunliposome, ballistische Verfahren, die direkte Aufnahme in Zellen etc., so wie dies hier beschrieben ist, gehören. Zur Behandlung einer Erkrankung werden die erfindungsgemässen Oligonucleotide an den Patienten in einer therapeutisch wirksamen Menge verabreicht. Eine therapeutisch wirksame Menge ist die Menge, die ausreicht, um die Krankheitssymptome zu lindern oder die Telomerase-Aktivität in der Zielzelle zu modulieren, wie dies beispielsweise unter Verwendung eines TRAP-Assays oder anderer geeigneter Assays bezüglich der biologischen Funktion von Telomerase bestimmt werden kann. Für die Zulieferung von Oligonucleotiden für therapeutische Zwecke geeignete Verfahren sind in dem US-Patent 5 272 065, das hiermit durch Bezugnahme als Bestandteil dieser Beschreibung anzusehen ist, beschrieben. Weitere Details bezüglich der Verabreichung von pharmazeutisch aktiven Verbindungen sind nachstehend beschrieben. In einer weiteren Ausführungsform können Oligo- und Polynucleotide unter Verwendung von Gentherapie und der erfindungsgemässen rekombinanten DNA-Expressionsplasmide zugeliefert werden.



## 3) Gentherapie

Gentherapie bezieht sich auf die Einführung eines ansonsten exogenen Polynucleotids, das auf die (typischerweise) Säuger-Zelle(n), in das (die) es überführt wird, eine medizinisch nützliche phänotypische Auswirkung hat. Ein Aspekt der vorliegenden Erfindung betrifft die Bereitstellung von Gentherapieverfahren und Zusammensetzungen für die Behandlung von Telomerase assoziierten Zuständen. In veranschaulichenden Ausführungsformen gehört zu der Gentherapie die Einführung eines Vektors in eine Zelle, der ein hTERT-Genprodukt exprimiert (z.B. ein hTERT-Protein, das im wesentlichen dem hTERT-Polypeptid mit einer Sequenz von SEQ. ID. Nr. 2 gleicht, beispielsweise um Telomerase-Aktivität zu steigern, oder ein inhibitorisches hTERT-Polypeptid zur Herabsetzung der Aktivität), die Expression einer Nucleinsäure mit einer Sequenz eines hTERT-Gens oder einer hTERT-mRNA (z.B. einer «antisense»-RNA, um beispielsweise Telomerase-Aktivität herabzusetzen), die Expression eines Polypeptids oder Polynucleotids, das auf andere Weise die Expression von hTERT-Genprodukten beeinflusst (z.B. ein Ribozym, das zur Herabsetzung von Telomerase-Aktivität gegen hTERT-mRNA gerichtet ist) oder den Austausch, oder das Unterbrechen einer endogenen hTERT-Sequenz (z. B. «gene replacement» und «gene knock-out»). Für den Fachmann sind nach Lesen dieser Beschreibung zahlreiche weitere Ausführungsformen offensichtlich. In einer Ausführungsform wird auch ein hTR-codierender Vektor eingeführt. In einer weiteren Ausführungsform werden auch Telomerase-assoziierte Proteine codierende Vektoren mit oder ohne einen Vektor für hTR eingeführt.

Für die hTERT-Gentherapie nützliche Vektoren können viral oder nicht-viral sein. Dazu zählen die im Zusammenhang mit den erfindungsgemässen hTERT-Expressionssystemen vorstehend beschriebenen Vektoren. Es ist für den Fachmann offensichtlich, dass Gentherapie-Vektoren Promotoren und andere regulatorische oder für die Prozessierung benötigte Sequenzen umfassen können, beispielsweise die hier beschriebenen. Üblicherweise umfassen die Vektoren einen Promotor und gegebenenfalls einen Enhancer (unabhängig von einem Enhancer, der innerhalb der Promotorsequenzen bereits vorhanden ist), die zur Steuerung der Transkription eines Oligoribonucleotids dienen, sowie weitere regulatorische Elemente, die für die Beibehaltung des Vektors als Episom oder für die chromosomale Integration und Transkription auf hohem Niveau sorgen, falls erwünscht. Ein für die Gentherapie nützliches Plasmid kann weitere funktionelle Elemente umfassen, beispielsweise selektierbare Marker, Identifizierungsbereiche und weitere Sequenzen. Zusätzliche Sequenzen können eine Rolle dabei spielen, sowohl ausserhalb als auch innerhalb der Zelle Stabilität zu verleihen, um für die zielgerichtete Zulieferung von hTERT-Nucleotidsequenzen («sense» oder «antisense») zu einem gewünschten Organ, Gewebe oder einer Zellpopulation zu bewirken, oder den Eintritt in eine Zelle, in den Nucleus einer Zelle und/oder die Integration innerhalb nucleärer DNA zu vermitteln.

Beispielsweise können Aptamer-ähnliche DNA-Strukturen oder andere Stellen der Einheiten, die Proteine binden, dazu verwendet werden, um die Bindung eines Vektors an Zelloberflächenrezeptoren oder an Serumproteine zu vermitteln, die an einen Rezeptor binden, wodurch die Effizienz des DNA-Transfers in die Zelle erhöht wird. Andere DNA-Stellen und Strukturen können direkt oder indirekt an Rezeptoren in der nucleären Membran oder an andere Proteine, die in den Nucleus wandern, binden, wodurch die nucleäre Aufnahme eines Vektors erleichtert wird. Andere DNA-Sequenzen können direkt oder indirekt die Effizienz der Integration beeinflussen.

Geeignete Vektoren für die Gentherapie können einen Replikationsursprung besitzen oder auch nicht. Beispielsweise ist es nützlich für die Vermehrung des Vektors vor der Verabreichung an einen Patienten einen Replikationsursprung in einen Vektor einzubauen. Der Replikationsursprung kann jedoch oft vor der Verabreichung entfernt werden, wenn der Vektor so entworfen ist, dass er sich in die chromosomale DNA des Wirts integrieren soll oder an die mRNA oder DNA des Wirts binden soll. In einigen Situationen (z.B. bei Tumorzellen) mag es nicht notwendig sein, dass sich die exogene DNA in die transduzierte Zelle stabil integriert, da eine transiente Expression ausreichen kann, um Zellen abzutöten.

Wie bereits erwähnt, stellt die vorliegende Erfindung auch Verfahren und Reagenzien für die «gene replacement»-Therapie zur Verfügung (d.h. der Austausch eines endogenen hTERT-Gens gegen ein rekombinantes Gen durch homologe Rekombination). Es können dafür speziell für eine Integration durch homologe Rekombination entworfene Vektoren verwendet werden. Zu den für die Optimierung der homologen Rekombination wichtige Faktoren zählen das Ausmass der Sequenzidentität und die Länge der Homologie zu chromosomalen Sequenzen. Die spezifische, die homologe Rekombination vermittelnde Sequenz ist ebenfalls wichtig, da eine Integration in transkriptionell aktive DNA wesentlich leichter stattfindet. Verfahren und Substanzen zur Konstruktion von Konstrukten für eine zielgerichtete homologe Rekombination sind beispielsweise beschrieben in Mansour et al., Nature 336 (1988), 348; Bradley et al., Bio/Technology 10 (1992), 534 und darüber hinaus in US-Patent Nr. 5 627 059; 5 487 992, 5 631 153 und 5 464 764. In einer Ausführungsform umfasst die «gene replacement»-Therapie die Änderung oder den Austausch aller regulatorischen Sequenzen oder eines Teils davon, die die Expression des zu regulierenden hTERT-Gens kontrollieren. Beispielsweise können die hTERT-Promotorsequenzen (z.B. solche, die in SEQ. ID. Nr. 6 (Fig. 21) vorkommen) unterbrochen werden (um so die hTERT-Expression zu verringern oder eine Kontrollstelle für die Transkription zu eliminieren) oder gegen einen exogenen Promotor ausgetauscht sein, beispielsweise um die hTERT-Expression zu erhöhen.

Die Erfindung stellt auch Verfahren und Reagenzien für den hTERT-«gene knockout» bereit (d.h. die

Deletion oder Unterbrechung eines endogenen hTERT-Gens durch homologe Rekombination unter Verwendung eines rekombinant hergestellten Vektors). Bei diesem «gene knockout» können die als Ziel in Betracht gezogene Sequenzen regulatorische Sequenzen sein (z.B. der hTERT-Promotor) oder RNA- oder Protein-codierende Sequenzen. Die Veränderung der Expression von endogenen Genen durch homologe Rekombination ist ausführlich beschrieben in dem US-Patent Nr. 5 272 071 (und den vorstehend zitierten US-Patenten), WO 91/09 955, WO 93/09 222, WO 96/29 411, WO 95/31 560 und WO 91/12 650. Siehe auch Moynahan et al., Hum. Mol. Genet. 5 (1996) 875.

Die vorliegende Erfindung stellt ferner Verfahren zur spezifischen Abtötung Telomerase-positiver Zellen oder zur Verhinderung der Transformation von Telomerase-negativen Zellen zu einem Telomerase-positiven Status bereit, wobei der hTERT-Genpromotor zur Regulation der Expression eines für die Zelle toxischen Proteins verwendet wird. Wie in Beispiel 14 gezeigt, kann eine hTERT-Promotorsequenz mit einem Reportergen funktionell verknüpft sein, so dass die Aktivierung des Promotors zur Expression des von dem Reportergen codierten Proteins führt. Falls anstelle eines Reporterproteins das codierte Protein für die Zelle toxisch ist, führt die Aktivierung des Promotors zur Zellmorbidity oder zum Tod der Zelle. Bei einer erfindungsgemässen Ausführungsform wird ein Vektor, der ein ein toxisches Protein codierendes Gen umfasst, das mit einem hTERT-Promotor funktionell verknüpft ist in Zellen, wie menschliche Zellen, beispielsweise Zellen in einem menschlichen Patienten, eingeführt, was zum Zelltod bei denjenigen Zellen führt, in denen hTERT-Promotor aktivierende Faktoren exprimiert werden, wie beispielsweise Krebszellen. Bei einer verwandten Ausführungsform ist das codierte Protein selbst nicht toxisch für eine Zelle, codiert jedoch eine Aktivität, die die Zelle gegenüber einem ansonsten nicht-toxischen Wirkstoff empfindlich macht. Tumore können beispielsweise durch Einführung eines hTERT-Promotor-Herpes-Thymidinkinase (TK)-Genfusionskonstrukts in Tumorzellen und die Verabreichung von Gangcyclovir oder des Äquivalents behandelt werden (siehe beispielsweise Moolton und Wells, J. Natl. Canc. Inst. 82 (1990), 297). Auf dem Fachgebiet sind auch zahlreiche weitere geeignete toxische oder potentiell toxische Proteine und Systeme bekannt (wobei sich von hTERT unterscheidende Promotorsequenzen verwendet werden), die vom Fachmann nach Lesen dieser Beschreibung gemäss der vorliegenden Erfindung modifiziert und verabreicht werden können.

Vektoren für die Gentherapie können in Zellen oder Gewebe in vivo, in vitro oder ex vivo eingeführt werden. Für die ex vivo-Therapie können Vektoren in von dem Patienten entnommene Stammzellen eingeführt werden und für die autologe Rücktransplantation in den selben Patienten clonal propagiert werden (siehe beispielsweise die US-Patente 5 399 493 und 5 437 994, wobei durch Bezugnahme diese Dokumente als Bestandteil der Beschreibung angesehen werden können). Zu den Zellen, die als Ziel für die hTERT-Gentherapie mit dem Ziel der Steigerung der Telomerase-Aktivität in einer Zielzelle in Betracht kommen, zählen, allerdings ohne Beschränkung darauf, Embryonalzellen oder Keimzellen, insbesondere Primatenzellen oder menschliche Zellen, wie vorstehend angemerkt, hämatopoetische Stammzellen (AIDS und nach der Chemotherapie), vaskuläre Endothelialzellen, (Erkrankungen der Herzgefässe und zerebralen Gefässe), Hautfibroblasten und Unterhautkeratinocyten (Wundheilung und Verbrennungen) Chondrocyten (Arthritis), Hirnastrocyten und Microglialzellen (Alzheimer Krankheit), Osteoblasten (Osteoporose) Retinazellen (Augenerkrankungen) und Pankreas-Inselzellen (Typ I Diabetes) sowie die in der nachstehenden Auflistung 1 aufgezählten Zellen.

In einer erfindungsgemässen Ausführungsform wird ein mit einer TRT-codierenden Sequenz (oder einer Variante davon) funktionell verknüpfter induzierbarer Promotor zur Modulation der Proliferationsfähigkeit von Zellen in vivo oder in vitro verwendet. In einer besonderen Ausführungsform werden beispielsweise Insulin-produzierende Pankreaszellen, die mit einem hTERT-Expressionsvektor unter der Kontrolle eines induzierbaren Promotors transfiziert sind, in einen Patienten eingeführt. Die Proliferationsfähigkeit der Zellen kann dann durch Verabreichung des den Promotor aktivierenden Mittels (z.B. Tetracyclin) an den Patienten kontrolliert werden, wobei dadurch sich die Zellen stärker vermehren können, als dies ansonsten möglich gewesen wäre. Die Zellproliferation kann dann, je nach dem, wie es von dem behandelnden Arzt gewünscht wird, beendet, fortgesetzt oder erneut initiiert werden.

#### 4) Vakzine und Antikörper

Immunogene Peptide oder Polypeptide mit einer hTERT-Sequenz können dazu verwendet werden, um eine anti-hTERT-Immunantwort in einem Patienten hervorzurufen (d.h. sie können als Vakzin wirken). Beispiele für immunogene hTERT-Peptide und Polypeptide sind nachstehend in den Beispielen 6 und 8 beschrieben. Eine Immunantwort kann auch durch Zulieferung von Plasmidvektoren, die das gewünschte Polypeptid codieren (d.h. die Verabreichung von «nackter DNA») ausgelöst werden. Die gewünschten Nucleinsäuren können durch Injektion, Liposome oder andere Verabreichungsmassnahmen zugeliefert werden. In einer Ausführungsform werden Immunisierungsarten ausgewählt, die in der Versuchsperson bzw. dem Patienten eine auf die MHC Klasse I restringierte Antwort cytotoxischer Lymphocyten gegen Telomerase exprimierende Zellen auslösen. Nach der Immunisierung wird in der Person oder dem Tier eine erhöhte Immunantwort gegen Zellen hervorgerufen, die hohe Konzentrationen von Telomerase exprimieren (z.B. maligne Zellen).

Anti-hTERT-Antikörper, beispielsweise von der Maus, vom Menschen, oder humanisierte monoclonale

Antikörper können ebenfalls zur Erzielung einer Immunantwort gegen Telomeraseexprimierende Zellen verabreicht werden (z.B. passive Immunisierung).

#### F) Arzneimittel

5

Verwandte Aspekte der vorliegenden Erfindung beziehen sich auf die Bereitstellung von Arzneimitteln, die hTERT-Oligo- und -Polynucleotide, -Polypeptide und -Antikörper, -Agonisten, -Antagonisten oder -Hemmstoffe, allein oder in Kombination mit mindestens einem weiteren Mittel, wie beispielsweise einer stabilisierenden Verbindung, einem Verdünnungsmittel, einem Träger oder einem anderen aktiven Bestandteil oder Agens, umfassen.

10

Die erfindungsgemässen Arzneimittel können in einem sterilen, biokompatiblen pharmazeutischen Träger, zu dem beispielsweise, jedoch ohne Beschränkung darauf, eine Kochsalzlösung, gepufferte Kochsalzlösung, Dextrose und Wasser gehören, verabreicht werden. Jedes dieser Moleküle kann dem Patienten allein verabreicht werden oder in Kombination mit anderen Mitteln, Arzneimitteln oder Hormonen, in Arzneimitteln, wo es mit einem oder mehreren geeigneten Exzipienten, Hilfsstoffen und/oder pharmazeutisch verträglichen Trägern vermischt ist. In einer erfindungsgemässen Ausführung ist der pharmazeutisch verträgliche Träger pharmazeutisch inert.

15

Die Verabreichung der Arzneimittel kann oral oder parenteral erfolgen. Zu den Verfahren für die parenterale Verabreichung gehören die topische, intra-arterielle (z.B. direkt zu dem Tumor), intramuskuläre, subkutane, intramedulläre, intrathekale, intraventrikuläre, intravenöse, intraperitoneale oder intranasale Verabreichung. Zusätzlich zu den aktiven Bestandteilen können diese Arzneimittel geeignete pharmazeutisch verträgliche Träger umfassen, die Exzipienten und andere Verbindungen umfassen, die die Verarbeitung der aktiven Bestandteile zu Zubereitungen erleichtern, die pharmazeutisch verwendet werden können. Weitere Details bezüglich Verfahren zur Formulierung und Verabreichung können in der neuesten Ausgabe von "Remington's Pharmaceutical Sciences" (Maack Publishing Co., Easton PA) gefunden werden.

20

Arzneimittel für die orale Verabreichung können unter Verwendung von auf dem Fachgebiet gut bekannten pharmazeutisch verträglichen Trägern in Dosen, die für eine orale Verabreichung geeignet sind, formuliert werden. solche Träger erlauben die Formulierung der Arzneimittel als Tabletten, Pillen, Dragees, Kapseln, Flüssigkeiten, Gele, Sirups, Aufschlämmungen, Suspensionen etc., die für die Aufnahme durch den Patienten geeignet sind. Siehe PCT-Veröffentlichung WO 93/23 572.

30

Arzneimittel für die orale Verwendung können durch die Kombination von aktiven Bestandteilen mit einem festen Exzipienten, gegebenenfalls durch Mahlen eines erhaltenen Gemischs, erhalten werden und Weiterverarbeitung des Granulatgemischs nach Zugabe geeigneter zusätzlicher Verbindung, umso, falls erwünscht, Tabletten oder Drageekerne zu erhalten. Geeignete Exzipienten sind Kohlenhydrat- oder Proteinfüllstoffe, dazu zählen, allerdings ohne Beschränkung darauf, Zucker, einschliesslich Lactose, Saccharose, Mannit oder Sorbit; Stärke aus Mais, Weizen, Reis, Kartoffel oder anderen Pflanzen; Cellulose, wie beispielsweise Methylcellulose, Hydroxypropylmethylcellulose oder Natriumcarboxymethylcellulose und Gummi, zu denen Gummi arabicum und Tragacanthharz zählen, sowie Proteine, wie beispielsweise Gelatine und Collagen. Falls erwünscht, können den Zerfall bewirkende oder solubilisierende Agenzien zugegeben werden, beispielsweise quer vernetztes Polyvinylpyrrolidon, Agar, Alginsäure oder ein Salz davon, beispielsweise Natriumalginat.

35

Drageekerne werden mit geeigneten Überzügen versehen, beispielsweise konzentrierten Zuckertlösungen, sie können auch Gummi arabicum, Talk, Polyvinylpyrrolidon, "Carbopol"-Gel, Polyethylenglykol und/oder Titandioxid, Lacklösungen und geeignete organische Lösungsmittel oder Lösungsgemische enthalten. Zu den Überzügen für die Tabletten oder Dragees können Farbstoffe oder Pigmente zugefügt werden, um das Produkt zu kennzeichnen oder die Menge an aktivem Wirkstoff (d.h. die Dosierung) zu kennzeichnen.

45

Zu den oral zu verwendenden Arzneimitteln gehören aus Gelatine hergestellte Steckkapseln sowie weiche verschlossene Kapseln, die aus Gelatine und einem Überzug aus Glycerin oder Sorbit hergestellt sind. Steckkapseln können die aktiven Bestandteile, vermischt mit einem Füllstoff oder Bindemitteln enthalten, dazu gehören Lactose oder Stärken, Gleitmittel, wie Talg oder Magnesiumstearat, und gegebenenfalls Stabilisatoren. In weichen Kapseln können die aktiven Verbindungen in geeigneten Flüssigkeiten gelöst oder suspendiert sein, beispielsweise in Fettsäuren, flüssigem Paraffin oder flüssigem Polyethylenglykol mit oder ohne Stabilisatoren. Zu den Arzneimitteln für die parenterale Verabreichung gehören wässrige Lösungen mit aktiven Verbindungen. Für die Injektion kann das erfindungsgemässe Arzneimittel in wässrige Lösungen formuliert werden, vorzugsweise in physiologisch kompatible Puffer, wie beispielsweise Hank's-Lösung, Ringer-Lösung oder in physiologisch gepufferter Kochsalzlösung. Wässrige Suspensionen für die Injektion können Substanzen enthalten, die die Viskosität der Suspension erhöhen, wie beispielsweise Natriumcarboxymethylcellulose, Sorbit oder Dextran. Zusätzlich können Suspensionen der aktiven Verbindungen als geeignete ölige Injektionssuspensionen hergestellt werden. Zu den geeigneten lipophilen Lösungsmitteln oder Vehikeln gehören Fettsäuren, wie beispielsweise Sesamöl oder synthetische Fettsäureester, wie beispielsweise Ethyloleat oder Triglyceride oder Liposome. Gegebenenfalls können die Suspensionen auch geeignete Stabilisatoren enthalten, oder Mittel, die die Löslichkeit der Verbindungen erhöhen, um so die Herstellung von hochkonzentrierten Lösungen zu gestatten.

60

65

Für die topische oder nasale Verabreichung werden in der Formulierung Penetrantien verwendet, die für die spezifische zu durchdringenden Barrieren geeignet sind. Solche Penetrantien sind auf dem Fachgebiet allgemein bekannt.

Die erfindungsgemässen Arzneimittel können durch Verfahren, die den auf dem Fachgebiet bekannten Verfahren gleichen, hergestellt werden (z.B. durch übliche Vermischungs-, Lösungs-, Granulierungs-, Drageeherstellungs-, Pulverisierungs-, Emulgierungs-, Einkapselungs-, Einschluss- oder Lyophilisierungsverfahren).

Die Arzneimittel können als ein Salz bereitgestellt werden und können mit vielen Säuren hergestellt werden, dazu zählen, allerdings ohne Beschränkung darauf, Salzsäure, Schwefelsäure, Essigsäure, Milchsäure, Weinsäure, Apfelsäure, Bernsteinsäure etc. Salze neigen dazu, in wässrigen oder anderen protonischen Lösungsmitteln löslicher zu sein als die entsprechende Form der freien Base. In anderen Fällen kann die bevorzugte Zubereitung ein lyophilisiertes Pulver in 1 mM–50 mM Histidin, 0,1% bis 2% Saccharose, und 2% bis 7% Mannit bei einem pH-Wert im Bereich von 4,5 bis 5,5 sein, das vor der Verwendung mit einem Puffer kombiniert wird.

Nach der Herstellung der Arzneimittel, die eine in einem verträglichen Träger formulierte erfindungsgemässe Verbindung umfassen, können sie in einen geeigneten Behälter gegeben und entsprechend der Behandlung eines angegebenen Krankheitszustands markiert werden. Bei der Verabreichung von menschlichen Telomerase-Proteinen und -Nucleinsäuren würde zu einer solchen Markierung die Angabe der Menge und Häufigkeit der Verabreichung sowie des Verabreichungsverfahrens zählen.

Zu den für die erfindungsgemässe Verwendung geeigneten Arzneimitteln zählen Zusammensetzungen, bei denen die aktiven Bestandteile zur Erzielung des gewünschten Zwecks in einer wirksamen Menge enthalten sind. «Therapeutisch wirksame Menge» oder «pharmakologisch wirksame Menge» sind allgemein gebräuchliche Ausdrücke und beziehen sich auf die Menge eines Agens, der das gewünschte pharmakologische Ergebnis wirksam hervorrufen kann. Somit ist eine therapeutisch wirksame Menge eine Menge, die ausreicht, um die Symptome der zu behandelnden Erkrankung zu verbessern.

Ein nützliches Assay zur Bestimmung einer wirksamen Menge für eine vorgegebene Anwendung (z.B. einer therapeutisch wirksamen Menge) besteht in der Messung des Effekts auf Telomerase-Aktivität in einer Zielzelle. Die tatsächlich verabreichte Menge hängt von der zu behandelnden Person ab und stellt vorzugsweise eine so optimierte Menge dar, dass der gewünschte Effekt ohne wesentliche Nebenwirkungen erzielt wird. Die Bestimmung einer therapeutisch wirksamen Dosis liegt im Bereich der Fähigkeiten des Fachmanns.

Für jede beliebige Verbindung kann die therapeutisch wirksame Dosis anfänglich entweder in Zellkulturassays oder mittels eines geeigneten Tiermodells bestimmt werden. Das Tiermodell wird auch dazu verwendet, um einen geeigneten Konzentrationsbereich und einen geeigneten Verabreichungsweg zu ermitteln. So gewonnene Informationen können dann dazu verwendet werden, nützliche Dosen und Verabreichungswege im Menschen zu bestimmen.

Eine therapeutisch wirksame Menge bezieht sich auf die Menge an Protein, Polypeptid, Peptid, Antikörper, Oligo- oder Polynucleotid, Agonist oder Antagonist, die die Symptome oder den Zustand bessert. Die therapeutische Wirksamkeit und Toxizität solcher Verbindungen kann durch pharmazeutische Standardprozeduren in Zellkulturen oder an Versuchstieren bestimmt werden (z.B. ED50, die in 50% der Population therapeutisch wirksame Dosis; und LD50, die in 50% der Population tödliche Dosis). Der therapeutische Index bezeichnet das Dosisverhältnis zwischen therapeutischen und toxischen Wirkungen und es kann als das Verhältnis ED50/LD50 ausgedrückt werden. Pharmazeutische Zusammensetzungen, die einen grossen therapeutischen Index aufweisen, sind bevorzugt. Die von Zellkulturassays und Tierstudien gewonnenen Daten werden zur Bestimmung des Dosierungsbereichs für die Anwendung beim Menschen verwendet. Die Dosierung solcher Verbindungen liegt vorzugsweise innerhalb eines Bereichs von Umlaufkonzentrationen, die die ED50 einschliessen, mit einer geringen oder keiner Toxizität. Die Dosierung variiert innerhalb dieses Bereichs in Abhängigkeit von der angewandten Dosierungsform, der Empfindlichkeit des Patienten und des Verabreichungswegs.

Die exakte Dosierung wird von dem jeweiligen Arzt individuell für den zu behandelnden Patienten ausgewählt. Die Dosierung und Verabreichung werden so eingestellt, dass sie einen ausreichenden Spiegel der aktiven Einheit bereitstellen, oder den gewünschten Effekt aufrechterhalten.

Zu den zusätzlichen Faktoren, die beachtet werden müssen, zählen die Schwere des Krankheitszustands (beispielsweise die Tumorgrosse und -Lage; das Alter, das Gewicht und Geschlecht des Patienten; die Ernährung sowie der Zeitpunkt und die Häufigkeit der Verabreichung, die Kombination(en) von Arzneimitteln, Reaktionsempfindlichkeit und Toleranz gegenüber bzw. Ansprechen auf die Therapie). Langwirkende Arzneimittel können alle 3 bis 4 Tage verabreicht werden, jede Woche, oder einmal alle 2 Wochen in Abhängigkeit von der Halbwertszeit und der «clearance»-Rate der speziellen Formulierung. Eine Anleitung bezüglich spezieller Dosierungen und Darreichungsverfahren ist in der Literatur zu finden (siehe US-Patent Nr. 4 657 760, 5 206 344 und 5 225 212, wobei diese Dokumente durch Bezugnahme als Bestandteil dieser Beschreibung angesehen werden können). Der Fachmann wird für Nucleotide andere Formulierungen verwenden als für Proteine oder ihre Inhibitor n. Genauso ist die Verabreichung von Polynucleotiden oder Polypeptiden spezifisch für bestimmte Zellen, Zustände, Lagen etc.

# VIII. Die Steigerung der Proliferationsfähigkeit und die Herstellung von immortalisierten Zellen, Zelllinien und Tieren.

Wie bereits vorstehend diskutiert, zeigen die meisten Vertebratenzellen nach einer begrenzten Anzahl von Teilungen in der Kultur (z.B. 50 bis 100 Teilungen) Seneszenz. Bestimmte Zellvarianten können sich jedoch in Kultur unbegrenzt teilen (z.B. HeLa-Zellen, 293-Zellen) und sind aus diesem Grund von Nutzen für die Forschung und industrielle Anwendung. Gewöhnlich werden solche unsterblichen Zelllinien von spontan entstehenden Tumoren oder nach Transformation durch Exposition gegenüber Strahlung oder einem Tumor-induzierenden Virus oder einer Tumor-induzierenden Chemikalie erhalten. Leider steht nur eine begrenzte Auswahl von Zelllinien, insbesondere von menschlichen Zelllinien, die differenzierte Zellfunktion zeigen, zur Verfügung. Darüber hinaus sind die zur Zeit verfügbaren unsterblichen Zelllinien durch chromosomale Anomalien gekennzeichnet (z.B. Aneuploidie, Gen-Rearrangements oder Mutationen). Ferner sind viele der bereits lang etablierten Zelllinien relativ undifferenziert (z.B. stellen sie nicht solche hochspezialisierte Produkte her, die für bestimmte Gewebe oder Organe einzigartig sind). Es besteht somit ein Bedarf an neuen Verfahren zur Erzeugung unsterblicher Zellen, insbesondere menschlicher Zellen. Eine Verwendung von immortalisierten Zellen bezieht sich auf die Herstellung von natürlichen Proteinen und rekombinanten Proteinen (z.B. therapeutische Polypeptide) oder Antikörper, für die eine stabile genetisch normale Zelllinie bevorzugt wird. Für die Herstellung einiger rekombinanter Proteine können auch spezialisierte Zelltypen bevorzugt werden (z.B. Pankreaszellen für die Herstellung von menschlichem Insulin). Eine weitere Verwendungsmöglichkeit für immortalisierte Zellen ist die Einführung in einen Patienten für eine Gentherapie oder für den Austausch von erkrankten oder beschädigten Zellen oder Gewebe. Beispielsweise können autologe Immunzellen, die beispielsweise ein erfindungsgemässes rekombinantes hTERT-Gen oder Polypeptid enthalten oder exprimieren für einen Zell-austausch in einem Patienten nach einer aggressiven Krebsterapie, beispielsweise nach der Bestrahlung des gesamten Körpers, verwendet werden. Eine weitere Verwendungsmöglichkeit für immortalisierte Zellen besteht in der ex vivo-Herstellung von «künstlichen» Geweben oder Organen (z.B. Haut) für eine therapeutische Anwendung. Eine weitere Verwendung solcher Zellen besteht im Screenen nach Wirkstoffen oder der Bestätigung der Wirkung von Wirkstoffen, beispielsweise Telomerase-hemmenden Wirkstoffen, oder bei der Herstellung von Vakzinen. Für den Fachmann sind weitere Verwendungsmöglichkeiten der erfindungsgemässen Zellen offensichtlich.

Die erfindungsgemässen immortalisierten Zellen und Zelllinien sowie solche mit lediglich erhöhter Replikationsfähigkeit werden durch Steigerung von Telomerase-Aktivität in der Zelle erzeugt. Es kann dabei jedes hier beschriebene Verfahren zur Steigerung von Telomerase-Aktivität angewendet werden. Somit werden in einer Ausführungsform Zellen durch Steigerung der Menge an hTERT-Polypeptid in der Zelle immortalisiert. In einer Ausführungsform wird der hTERT-Spiegel durch Einführung eines hTERT-Expressionsvektors in die Zelle (wobei gelegentlich eine stabile Transfektion bevorzugt wird) erhöht. Wie bereits vorstehend diskutiert ist die hTERT-codierende Sequenz normalerweise mit einem Promotor funktionell verknüpft, der in der Zelle induzierbar oder konstitutiv aktiv sein kann.

In einer Ausführungsform umfasst ein Polynucleotid eine Sequenz, die ein Polypeptid der SEQ. ID. Nr. 2 umfasst, wobei die Sequenz mit einem Promotor (z.B. einem konstitutiv exprimierten Promotor, z.B. eine Sequenz von SEQ. ID. Nr. 6 (Fig. 6)) funktionell verknüpft ist und wobei das Polynucleotid in die Zelle eingeführt wird. In einer Ausführungsform umfasst das Polynucleotid eine Sequenz von SEQ. ID. Nr. 1. Vorzugsweise enthält das Polynucleotid Polyadenylierungs- und Terminationssignale. In weiteren Ausführungsformen sind zusätzliche Elemente, wie Enhancer oder solche wie sie vorstehend diskutiert wurden, enthalten. In einer alternativen Ausführungsform enthält das Polynucleotid keine Promotorsequenz, wobei dann eine solche Sequenz durch das endogene Genom der Zielzelle nach Integration (z.B. durch Rekombination, z.B. homologe Rekombination) des eingeführten Polynucleotids bereitgestellt wird. Das Polynucleotid kann durch jedes beliebige Verfahren in die Zielzelle eingeführt werden, dazu zählen die hier beschriebenen Verfahren (wie beispielsweise Lipofektion, Elektroporation, Virosome, Liposome, Immunliposome, Polykation/Nucleinsäure-Konjugate, nackte DNA).

Unter Verwendung der erfindungsgemässen Verfahren kann eine beliebige Vertebraten-Zelle dazu gebracht werden, eine gesteigerte Proliferationsfähigkeit zu zeigen oder sogar immortalisiert zu sein und in Kultur unbegrenzt erhalten zu bleiben. In einer Ausführungsform sind die Zellen Säugerzellen, wobei für viele Anwendungen menschliche Zellen bevorzugt sind. Zu den menschlichen Zellen, die immortalisiert werden können, gehören die in Auflistung 1 aufgezählten Zellen.

Natürlich können die nachstehend beschriebenen erfindungsgemässen «diagnostischen» Assays dazu verwendet werden, um die erfindungsgemässen immortalisierten Zellen zu identifizieren und zu charakterisieren.

## Auflistung 1

Menschliche Zellen, in denen die hTERT-Expression gesteigert werden kann

## Hornbildende Epithel-Zellen

- 5 Keratinocyten der Epidermis (sich differenzierende Epidermiszellen)  
 Basalzellen der Epidermis (Stammzellen)  
 Keratinocyten der Fingernägel und Zehennägel  
 Basalzellen des Nagelbetts (Stammzellen)
- 10 Zellen des Haarschafts  
 medulläre, kortikale, kutikuläre Zellen; Zellen der Haarwurzelscheide, kutikuläre Zellen, Zellen der Huxley-Schicht, externe Zellen der Henle-Schicht; Haarkeimzellen (Stammzellen)

## Zellen der feuchten mehrschichtigen Grenzepithel

- 15 Oberflächen-Epithelzellen des mehrschichtigen Plattenepithels der Zunge, der Mundhöhle, der Speiseröhre, des Analkanals, der distalen Harnröhre, der Vagina  
 Basalzellen dieser Epithel (Stammzellen)  
 Zellen des äusseren Hornhautepithels
- 20 Zellen des Harnepithels (das die Blase und die Harnleiter auskleidet)

## Epithelzellen, die auf die exokrine Sekretion spezialisiert sind

- Zellen der Speicheldrüsen
- 25 schleimsezernierende Zellen (Sekret reich an Polysacchariden)  
 seröse Drüsenzellen (Sekret reich an Glycoproteinenzymen)  
 Zellen der von Ebner-Drüsen in der Zunge (Sekret umspült die Geschmacksknospen)  
 Zellen der Brustdrüse, sezernieren Milch  
 Zellen der Tränendrüse, sezernieren Tränen
- 30 Zellen der Zeruminaldrüse des Ohres, sezernieren Zerumen  
 Zellen der ekkrinen Schweißdrüsen, sezernieren Glycoproteine (dunkle Zellen)  
 Zellen der ekkrinen Schweißdrüsen, sezernieren kleine Moleküle (helle Zellen)  
 Zellen der apokrinen Schweißdrüsen (Duftsekret, Geschlechtshormon-sensitiv)  
 Zellen der Moll-Drüsen im Augenlid (spezialisierte Schweißdrüse)
- 35 Zellen der Talgdrüsen, sezernieren Lipid-reiches Sebum  
 Zellen der Bowman-Drüsen in der Nase (Sekret umspült das Riechepithel)  
 Zellen der Brunner-Drüsen im Duodenum, sezernieren alkalische Lösung bestehend aus Schleim und Enzymen
- Zellen der Samenblase, sezernieren Bestandteile der Samenflüssigkeit einschliesslich Fructose (als Treibstoff für darin schwimmende Spermien)
- 40 Zellen der Vorsteherdrüse, sezernieren andere Bestandteile der Samenflüssigkeit  
 Zellen der Bulbourethraldrüse, sezernieren Schleim  
 Zellen der Bartholin-Drüse, sezernieren Vaginalsekret  
 Zellen der Littre-Drüse, sezernieren Schleim
- 45 Zellen der Uterusschleimhaut, sezernieren vornehmlich Kohlenhydrate  
 isolierte Becherzellen des Atmungs- und Verdauungstrakts, sezernieren Schleim  
 schleimsezernierende Zellen der Magenschleimhaut  
 Hauptzellen der Magendrüsen, sezernieren Pepsinogen
- 50 Parietalzellen der Magendrüsen, sezernieren HCl  
 Acinuszellen der Bauchspeicheldrüse, sezernieren Verdauungsenzyme und Bicarbonat  
 Paneth-Zellen des Dünndarms, sezernieren Lysozym  
 Typ-II-Alveolarzellen der Lunge, sezernieren Surfactant Clara-Zellen der Lunge

- 55 Zellen, die auf die Sekretion von Hormonspezialisiert sind

- Zellen des Hypophysenvorderlappens, sezernieren Wachstumshormon, Follikel-stimulierendes Hormon, luteinisierendes Hormon, Prolactin, adrenocorticotropes Hormon und thyreotropes Hormon  
 Zellen des Hypophysenmittellappens, sezernieren melanocytenstimulierendes Hormon
- 60 Zellen des Hypophysenhinterlappens, sezernieren Oxytocin, Vasopressin  
 Zellen des Intestinums, sezernieren Serotonin, Endorphin, Somatostatin, Gastrin, Sekretin, Cholecystokinin, Insulin und Glucagon  
 Zellen der Schilddrüse, sezernieren Schilddrüsenhormon, Calcitonin  
 Zellen der Nebenschilddrüse, sezernieren Parathormon, oxyphile Zelle
- 65 Zellen der Nebenniere, sezernieren Epinephrin, Norepinephrin und Steroidhormone

- Min ralocorticoide  
Glucocorticoide  
Zellen der Gonaden, sezernieren Testosteron (Leydig-Zellen der Hoden) Östrogen (innere Thekazellen des Eifollikels) Progesteron (Gelbkörperzellen des geborstenen Eifollikels)
- 5 Zellen des juxtaglomerulären Apparats der Niere juxtaglomeruläre Zellen (sezernieren Renin)  
Macula-densa-Zellen  
peripolare Zellen  
Mesangialzellen
- 10 Absorbierende Epithelzellen im Intestinum, den exokrinen Drüsen und dem Urogenitaltrakt
- Bürstensaumzellen des Intestinums (mit Kleinzotten)  
mehrschichtige Ductuszellen exokriner Drüsen  
Gallenblasen-Epithelzellen
- 15 Bürstensaumzellen des proximalen Tubulus der Niere  
distale Tubuluszellen der Niere  
nicht-bewimperte Zellen des Ductulus efferens  
Nebenhoden-Hauptzellen  
Nebenhoden-Basalzellen
- 20 Auf Stoffwechsel und Speicherung spezialisierte Zellen
- Hepatocyten (Leberzellen)  
Fettzellen
- 25 weisse Fettzellen  
braune Fettzellen  
Lipocyten der Leber
- Epithelzellen, die vornehmlich eine schützende Funktion haben und die die Lunge, das Intestinum, die exokrinen Drüsen und den Urogenitaltrakt auskleiden
- 30 Typ-I-Pneumocyten (kleiden den Luftraum der Lunge aus)  
Pankreasgangzellen (zentroazinäre Zellen)  
nicht-mehrschichtige Ductuszellen der Schweißdrüse, der Speicheldrüse, der Brustdrüse
- 35 Parietalzellen des Nierenglomerulus  
Podocyten des Nierenglomerulus  
Zellen des dünnen Segments der Henle-Schleife (in der Niere)  
Sammelrohrzellen (in der Niere)  
Ductuszellen der Samenblase, Vorsteherdrüse
- 40 Epithelzellen, die geschlossene innere Körperhöhlen auskleiden
- vasculäre Endothelzellen der Blutgefässe und der Lymphgefässe  
fenestrierte Zellen
- 45 kontinuierliche Zellen  
Milzzellen  
Synovialzellen (kleiden die Gelenkhöhlen aus, sezernieren vornehmlich Hyaluronsäure)  
Serosazellen (kleiden die Peritoneal-, Pleura- und Perikardhöhle aus)  
Plattenepithelzellen, die den perilymphatischen Raum des Ohrs auskleiden
- 50 Zellen, die den endolymphatischen Raum des Ohrs auskleiden  
Plattenepithelzellen  
hochprismatische Epithelzellen des Saccus endolymphaticus  
mit Kleinzotten  
ohne Kleinzotten
- 55 «dunkle» Zellen  
Zellen der Reissner-Membran (die den Zellen des Plexus choroideus ähneln)  
vaskuläre Stria-Basalzellen  
vaskuläre Stria-von-Ebner-Halbmond-Zellen  
Claudius-Zellen
- 60 Böttcher-Zellen  
Plexus-choroideus-Zellen (sezernieren Gehirn- und Rückenmarksflüssigkeit)  
Plattenepithelzellen der weichen Hirn- und Rückenmarkshaut  
Ziliarepithelzellen des Auges  
pigmenthaltige Zellen nicht-pigmenthaltige Zellen
- 65 Zellen des inneren Korneaepithels

Zilientragende Zellen mit propulsiver Funktion

- des Atmungstrakts  
 der Eileiter und der Gebärmutter Schleimhaut (bei der Frau)  
 5 des Haller-Netzes und des Ductulus efferens (beim Mann)  
 des zentralen Nervensystems (Ependymzellen, die die Hirnhöhle auskleiden)

Zellen, die auf die Sekretion extrazellulärer matrix spezialisiert sind

- 10 Epithelzellen:  
 Ameloblasten (sezernieren den Zahnschmelz)  
 Ebner-Halbmondzellen des Gleichgewichtsorgans des Ohrs (sezernieren Proteoglycan)  
 Interdentalzellen des Corti-Organ (sezernieren Membrana tectoria, die die Haarzellen des Corti-Organ bedeckt)  
 15 Nichtepithelzellen (Bindegewebe)  
 Fibroblasten (verschiedene Fibroblasten des lockeren Bindegewebes, der Kornea, der Sehnen, des retikulären Bindegewebes des Knochenmarks etc.)  
 Pericyten der Blutkapillaren  
 Nucleus-pulposus-Zellen der Bandscheibe  
 20 Cementoblasten/Cementocyten (sezernieren knochenartigen Zementum der Zahnwurzel)  
 Odontoblasten/Odontocyten (sezernieren das Zahndentin)  
 Chondrocyten  
 Hyalinknorpel, Faserknorpel, elastische Knorpel  
 Osteoblasten/Osteocyten  
 25 Osteoprogenitorzellen (Stammzellen der osteoblasten)  
 Hyalocyten des Glaskörpers des Auges Sternzellen des perilymphatischen Raums des Ohres

Kontraktionsfähige Zellen

- 30 Skelettmuskelzellen  
 rote Zellen (langsam)  
 weisse Zellen (schnell)  
 intermediäre Zellen  
 Kernhaufenzellen der Muskelspindel  
 35 Kernkettenzellen der Muskelspindel  
 Satellitenzellen (Stammzellen)  
 Herzmuskelzellen  
 normale Zellen  
 Knotenzellen  
 40 Purkinje-Faserzellen  
 Zellen der glatten Muskulatur  
 Myoepithelzellen  
 der Iris  
 der exokrinen Drüsen

- 45 Zellen des Blut- und Immunsystems

- rote Blutkörperchen  
 Megakaryocyten  
 50 Makrophagen  
 Monocyten  
 Makrophagen des Bindegewebes (verschiedene Arten)  
 Langerhans-Zellen (in der Epidermis)  
 Osteoklasten (im Knochen)  
 55 dendritische Zellen (im Lymphgewebe)  
 Mikrogliazellen (im zentralen Nervensystem)  
 Neutrophile  
 Eosinophile  
 Basophile  
 60 Mastzellen  
 T-Lymphocyten  
 T-Helferzellen  
 T-Suppressorzellen  
 zytotoxische T-Zellen  
 65 B-Lymphocyten



- Igm
- IgG
- IgA
- IgE
- 5 Killerzellen
- Stammzellen für das Blut- und Immunsystem (verschiedene Arten)
- Sinneszellen
- 10 Photorezeptorzellen
- Stäbchenzellen
- Zapfenzellen
- blau-empfindliche Zellen
- grün-empfindliche Zellen
- 15 rot-empfindliche Zellen
- Zellen des Hörorgans
- innere Haarzelle des Corti-Organs
- äussere Haarzelle des Corti-Organs
- Zellen zur Wahrnehmung von Beschleunigung und Schwerkraft
- 20 Typ-I-Haarzellen des Gleichgewichtsorgans des Ohrs
- Typ-II-Haarzellen des Gleichgewichtsorgans des Ohrs
- Geschmackszellen
- Typ-II-Geschmacksknospenzellen
- Zellen zur Wahrnehmung von Gerüchen
- 25 Riechneuronen
- Basalzellen des Riechepithels (Stammzellen für Riechneuronen)
- Zellen zur Bestimmung des pH-Wertes des Bluts
- Karotiskörperzellen
- Typ-I-Zellen
- Typ-II-Zellen
- 30 Zellen zur Wahrnehmung von Berührungen
- Merkelzellen der Epidermis
- primäre sensible Neuronen, auf Wahrnehmung von Berührungen spezialisiert
- Zellen zur Wahrnehmung von Temperatur
- primäre sensible Neuronen, auf Wahrnehmung von Temperatur spezialisiert
- 35 Kälte-empfindliche Zellen
- Wärme-empfindliche Zellen
- Zellen zur Wahrnehmung von Schmerz
- primäre sensible Neuronen, auf Wahrnehmung von Schmerz spezialisiert
- Strukturen und Kräfte im Bewegungsapparat
- 40 proprioceptive primäre sensible Neuronen
- Autonome Neuronen
- cholinerge Neuronen
- 45 adrenerge Neuronen
- peptiderge Neuronen
- Zellen, die die Sinnesorgane und die peripheren Neuronen unterstützen
- 50 Stützzellen des Corti-Organs
- innere Pfeilerzellen
- äussere Pfeilerzellen
- innere Phalangealzellen
- äussere Phalangealzellen
- 55 Grenzzellen
- Hensen-Zellen
- Stützzellen des Gleichgewichtsorgans
- Stützzellen der Geschmacksknospen (Typ-I-Geschmacksknospenzellen)
- Stützzellen des Riechepithels
- 60 Schwann-Zellen
- Satellitenzellen (umschliessen die peripheren Nervenzellen)
- Darm-Gliazellen
- Neuronen und Gliazellen des zentralen Nervensystems
- 65

- Neuronen
- Gliazellen
- Astrocyten
- Oligodendrocyten
- 5 Zellen der Linse
- Epithelzellen der Vorderlinse
- 10 Linsenfaserzellen (Kristallin-enthaltende Zellen)
- Pigmentzellen
- Melanocyten
- pigmenthaltige Epithelzellen der Netzhaut
- 15 Keimzellen
- Oogonium, Oocyten
- Spermatocyten
- 20 Spermatogonium (Stammzellen für Spermatocyten)
- Ammenzellen
- Eifollikelzellen
- 25 Sertolizellen (in den Hoden)
- Thymus-Epithelzellen
- Stammzellen
- 30 embryonale Stammzellen
- embryonale Keimzellen
- Stammzellen des Erwachsenen
- fötale Stammzellen

## 35 IX. Diagnostische Assays

### A. Einführung

#### 1)TRT-Assays

- 40 Die vorliegende Erfindung stellt eine grosse Anzahl von Assays für TRT, vorzugsweise hTRT, und Telomerase bereit. Diese Assays liefern unter anderem die Basis für empfindliche, preiswerte, leicht zu handhabende und in einem weiten Bereich anwendbare Assays für die Diagnose und Prognose einer Reihe von menschlichen Erkrankungen, zu denen als veranschaulichendes Beispiel Krebs zählt. Wie bereits vorstehend angemerkt, ist die Menge an hTRT-Genprodukten (Protein und mRNA) in unsterblichen menschlichen Zellen im Vergleich zu den meisten normalen sterblichen Zellen (d.h. Telomerase-negative Zellen und die meisten Telomerasepositiven normalen somatischen Zellen von Erwachsenen) gewöhnlich erhöht. Somit besteht ein Aspekt der Einfügung in der Bereitstellung von Assays, die zum Nachweis unter der Bestimmung der Anwesenheit, des Fehlens oder der Menge eines hTRT-Genprodukts in einer Probe, um so die Zellen als unsterblich (beispielsweise eine maligne Tumorzelle), sterblich (wie beispielsweise die meisten somatischen Zellen in Erwachsenen), als Telomerase-positiv oder Telomerase-negativ charakterisieren zu können, wobei die Probe von menschlichen oder anderen Säugerzellen oder eukaryotischen Zellen stammt oder diese enthält.

- 55 Jeder Zustand, der durch die Anwesenheit oder das Fehlen eines hTRT-Genprodukts (d.h. Protein oder RNA) gekennzeichnet ist, kann unter Verwendung der hier beschriebenen Verfahren und Substanzen diagnostiziert werden. Zu diesen gehören, so wie dies ausführlicher nachstehend beschrieben wird, Krebserkrankungen, andere mit beschleunigter Zellproliferation einhergehende Erkrankungen, immunologische Funktionsstörungen, Fruchtbarkeit, Unfruchtbarkeit etc. Da das Ausmass, in dem Telomerase Aktivität in Krebszellen erhöht ist, mit den Merkmalen des Tumors, beispielsweise dem Potential zur Metastasenbildung, korreliert, kann durch Überwachung der hTRT-, mRNA- oder Protein-Spiegel die wahrscheinliche zukünftige Entwicklung eines Tumors abgeschätzt und vorhergesagt werden.

- 60 In einem Aspekt gehört zu den erfindungsgemässen diagnostischen und prognostischen Verfahren die Bestimmung, ob ein menschliches TRT-Genprodukt in einer biologischen Probe (z.B. von einem Patienten) vorhanden ist. Ein zweiter Aspekt betrifft die Bestimmung der Menge eines hTRT-Genprodukts in einer biologischen Probe (z.B. von einem Patienten) und den Vergleich mit der Menge in einer Ko-

trollprobe (z.B. normale Zellen oder Gewebe). Ein dritter Aspekt betrifft die Bestimmung der zellulären oder intrazellulären Lokalisierung eines hTERT-Genprodukts in einer Zell- oder Gewebeprobe. Ein vierter Aspekt betrifft die Untersuchung von Wirtszellen (z.B. eines Patienten) zur Identifizierung von Nucleinsäuren mit Sequenzen, die charakteristisch für eine vererbte Neigung für eine anormale hTERT-Genexpression sind (anormale Menge, Regulation oder anormales Produkt), wobei dies von Nutzen ist beim genetischen Screening oder bei einer genetischen Beratung. Ein fünfter Aspekt betrifft die Verwendung der erfindungsgemässen Assays zum Nachweis des Vorhandenseins von anti-hTERT-Antikörpern (z.B. in Patientenserum). Die ausführlicher nachstehend beschriebenen Verfahren stellen nützliche Assays dar, die unter Verwendung der hier beschriebenen Sequenzen und Zusammenhänge ausgeführt werden können. Für den Fachmann sind natürlich zahlreiche Variationen oder weitere Anwendungsmöglichkeiten dieser Assays offensichtlich.

Zwar sind die vorstehend beschriebenen Assays im Zusammenhang mit diagnostischen und prognostischen Verfahren beschrieben, sie können jedoch immer dann verwendet werden, wenn ein hTERT-Gen, Genprodukt oder eine Variante nachgewiesen, quantifiziert oder charakterisiert werden soll. Somit sind beispielsweise die nachstehend beschriebenen «diagnostischen» Verfahren zur Untersuchung von hTERT oder Telomerase während der Herstellung und Reinigung von hTERT oder menschlicher Telomerase, für die Charakterisierung von Zelllinien, die von menschlichen Zellen stammen (z.B. zur Identifizierung unsterblicher Linien), für die Charakterisierung von Zellen, Tieren, Pflanzen, Pilzen, Bakterien oder anderen Organismen, die ein menschliches TRTGen oder Genprodukt (oder Fragmente davon) enthalten, von Nutzen.

Der hier verwendete Ausdruck «diagnostisch» besitzt seine normale Bedeutung, nämlich die Identifizierung der Anwesenheit oder der Natur der Erkrankung (beispielsweise Krebs), eines Zustands (z.B. unfruchtbar, aktiviert), eines Status (z.B. fruchtbar) und der Ausdruck «prognostisch» hat ebenfalls seine übliche Bedeutung, nämlich die Prognose der wahrscheinlichen Entwicklung und/oder des Ausgangs einer Erkrankung oder eines Zustands. Zwar werden diese beiden Bezeichnungen in einem klinischen Umfeld gelegentlich auf unterschiedliche Weise verwendet. Jeder der nachstehend beschriebenen Assays oder Assayformate im Bezug auf «Diagnose» ist gleichermassen geeignet für das Stellen einer Prognose, da es inzwischen klar ist, dass höhere Spiegel an Telomerase-Aktivität mit einer schlechteren Prognose für Krebspatienten in Zusammenhang stehen und da die vorliegende Erfindung Nachweisverfahren bereitstellt, die für hTERT spezifisch sind, das mit Konzentrationen exprimiert wird, die mit Telomerase-Aktivität in einer Zelle eng korrelieren.

## 2) Diagnose und Prognose von Krebs

Die Bestimmung eines hTERT-Gens-, -mRNA- oder -Protein-Spiegels der über dem normalen oder Standardbereich liegt, zeigt die Anwesenheit von Telomerase-positiven Zellen oder unsterblichen Zellen an, zu denen beispielsweise bestimmte Tumorzellen zählen. Da bestimmte embryonale und fötale Zellen sowie bestimmte «erwachsene» Stammzellen Telomerase exprimieren, stellt die vorliegende Erfindung auch Verfahren zur Bestimmung anderer Zustände wie z.B. Schwangerschaft, durch den Nachweis oder die Isolierung von Telomerase positiven fötalen Zellen aus dem Blut der Mutter. Diese Werte können dazu verwendet werden, eine Diagnose zu erstellen oder sie können bei der Erstellung einer Diagnose hilfreich sein, selbst wenn die Zellen unter Verwendung traditioneller Methoden nicht als krebsartig hätten klassifiziert werden oder anderweitig nachgewiesen oder klassifiziert werden können. Somit erlauben die erfindungsgemässen Verfahren den Nachweis oder die Verifikation von krebsartigen oder anderen Zuständen, die mit Telomerase assoziiert sind, mit erhöhter Zuverlässigkeit und möglicherweise in einem früheren Stadium. Die erfindungsgemässen Assays erlauben die Unterscheidung zwischen Klassen und Stadien von menschlichen Tumoren oder anderen mit der Zellproliferation in Zusammenhang stehenden Erkrankungen, dadurch, dass sie quantitative Assays für das hTERT-Gen und -Genprodukte bereitstellen und damit die Wahl geeigneter Behandlungsvorgehensweisen sowie genaue Diagnosen erleichtern. Da der Spiegel an Telomerase-Aktivität dazu verwendet werden kann, um zwischen gutartigen und malignen Tumoren zu unterscheiden (z.B. US-Patent Nr. 5 489 508 und Hiyama et al., Proc. Am. Ass. Cancer Res. 38 (1997), 637), um das Bestehen einer Invasion vorherzusagen (z.B. US-Patent Nr. 5 639 613 und Yashima et al., Proc. Am. Ass. Cancer Res. 38 (1997), 326) und um eine Korrelation mit dem Potential zur Metastasenbildung herzustellen (z.B. US-Patent Nr. 5 648 215 und Pandita et al., Proc. Am. Ass. Cancer Res. 37 (1996), 559), werden diese Assays darüber hinaus für die Prophylaxe, den Nachweis und die Behandlung einer grossen Anzahl von menschlichen Krebsarten von Nutzen sein.

Für die Prognose von Krebserkrankungen (oder anderer Erkrankungen oder Zustände, die durch eine erhöhte Telomerase-Konzentration gekennzeichnet sind) wird ein prognostischer Wert für ein hTERT-Genprodukt (mRNA oder Protein) oder die Aktivität für einen bestimmten Tumortyp, Tumorklasse oder ein Tumorstadium, wie nachstehend beschrieben, bestimmt. Der Spiegel an hTERT-Protein oder -mRNA oder Telomerase-Aktivität in einem Patienten, kann beispielsweise unter Verwendung der hier beschriebenen Assays bestimmt und mit dem prognostischen Spiegel verglichen werden.

In Abhängigkeit von dem verwendeten Assay wird in einigen Fällen die Häufigkeit eines hTERT-Genprodukts in einer Probe als erhöht angesehen werden, wann immer es durch den Assay nachweisbar

ist. Aufgrund der geringen Menge von hTERT-mRNA und Protein selbst in Telomerase-positiven Zellen und der Seltenheit oder des Fehlens dieser Genprodukte in normalen oder Telomerase-negativen Zellen sind empfindliche Assays erforderlich, um nachweisen zu können, ob die hTERT-Genprodukte überhaupt in normalen Zellen vorhanden sind. Wenn weniger empfindliche Assays ausgewählt werden, werden zwar hTERT-Genprodukte in gesundem Gewebe nicht nachweisbar sein, jedoch in Telomerase-positivem Krebs- oder bei anderen Telomerase-positiven Zellen. Typischerweise beträgt die Menge eines hTERT-Genprodukts in einer Probe mit einer erhöhten Konzentration mindestens etwa das 5fache, häufiger mindestens etwa das 10fache, noch häufiger mindestens das 50fache und sehr oft mindestens das etwa 100 bis 1000fache im Vergleich zum Spiegel von Telomerase-negativen Kontrollzellen oder Zellen von gesunden Geweben eines Erwachsenen, wobei der Prozentsatz von Telomerase-positiv normalen Zellen sehr gering ist.

Die erfindungsgemässen diagnostischen und prognostischen Verfahren können bei jeder Zelle oder jedem Gewebetyp jeden Ursprungs verwendet werden und sie können zum Nachweis einer unsterblichen oder neoplastischen Zelle, eines Tumorgewebes oder eines Krebses jeden Ursprungs verwendet werden. Zu den Krebsarten, die nachgewiesen werden können, zählen, jedoch ohne Beschränkung darauf, all jene, die hinsichtlich der Diskussion der therapeutischen Anwendung von hTERT vorstehend aufgezählt wurden.

Die erfindungsgemässen Assays sind darüber hinaus zur Überwachung der Wirksamkeit einer therapeutischen Intervention in Patienten, die wegen einer Krebserkrankung behandelt werden, von Nutzen. Zu den Behandlungen von Krebs, die überwacht werden können, gehören alle gegenwärtig empfohlenen Therapieformen (einschliesslich Chemotherapie, Bestrahlungstherapie und chirurgische Massnahmen) und dazu zählen auch zukünftige Behandlungen, beispielsweise die hier beschriebenen Therapien, die sich auf die Hemmung oder Aktivierung von Telomerase beziehen (siehe beispielsweise PCT-Veröffentlichung Nr. 96/01 835 und 96/40 868 und US-Patent Nr. 5 583 016; sowie auch US-Patentanmeldungen mit der Serien Nr. 08/472 802 und 08/482 115, die beide am 7. Juni 1995 eingereicht wurden; 08/521 634, eingereicht am 1. August 1995; 08/714 482, eingereicht am 16. September 1996 und 08/770 564 und 08/770 565, die beide am 20. Dezember 1996 eingereicht wurden, wobei all diese Dokumente aufgrund der Bezugnahme in ihrer Gesamtheit als Bestandteil dieser Beschreibung angesehen werden können).

In einem weiteren Aspekt sind die nachstehend beschriebenen Assays für den Nachweis bestimmter Variationen in der hTERT-Gensequenz (Mutationen und vererbare hTERT-Allele) von Nutzen, die eine Prädisposition für Krebserkrankungen oder andere Zustände anzeigt, die mit einer anormalen Regulation der Telomerase-Aktivität assoziiert sind (Unfruchtbarkeit, vorzeitiges Altern).

### 3) Diagnose von Zuständen, bei denen es sich nicht um Krebs handelt

Zusätzlich zu der Diagnose von Krebserkrankungen haben die erfindungsgemässen Assays zahlreiche weitere Anwendungsmöglichkeiten. Die vorliegende Erfindung stellt Reagenzien und Verfahren zur Diagnose von Zuständen oder Erkrankungen bereit, die durch eine Unter- oder Überexpression von Telomerase oder hTERT-Genprodukten in Zellen charakterisiert sind. In Erwachsenen wird ein niedriger Spiegel an Telomerase-Aktivität normalerweise bei einer begrenzten Art von normalen menschlichen somatischen Zellen gefunden, beispielsweise Stammzellen, aktivierten Lymphocyten und Keimzellen. Die Telomerase-Aktivität fehlt bei anderen somatischen Zellen. Somit ist der Nachweis von hTERT oder Telomerase-Aktivität in Zellen, in denen diese normalerweise fehlen oder inaktiv sind, oder der Nachweis eines anormalen Spiegels (d.h. eines höheren oder niedrigeren im Vergleich zum normalen) in Zellen, in denen hTERT normalerweise nur mit einem niedrigen Spiegel vorhanden ist (wie beispielsweise Stammzellen, aktivierte Lymphocyten und Keimzellen) ein diagnostisches Anzeichen für eine mit Telomerase in Zusammenhang stehende Erkrankung oder einen Zustand. Dieser Nachweis kann auch zur Identifizierung oder Isolierung spezifischer Zelltypen verwendet werden. Zu den Beispielen für solche Erkrankungen und Zustände gehören: Erkrankungen bezüglich der Zellproliferation, immunologische Funktionsstörungen, Unfruchtbarkeit, Erkrankungen hinsichtlich der Immunzellfunktion, Schwangerschaft, fötale Anomalität, vorzeitige Alterung etc. Darüber hinaus sind die erfindungsgemässen Assays zur Überwachung der Wirksamkeit einer therapeutischen Intervention (wozu, ohne Beschränkung darauf, Wirkstoffe gehören, die Telomerase-Aktivität modulieren) bei einem Patienten oder in einem Assay, der auf Zellen oder einem Tier basiert. Ein Aspekt der Erfindung betrifft die Bereitstellung von Assays, die zur Diagnose von Unfruchtbarkeit von Nutzen sind. Menschliche Keimzellen (z.B. Stammsamenzellen, Vorläufer oder Nachkommen) können unbegrenzt proliferieren und sind durch eine hohe Telomerase-Aktivität gekennzeichnet. Anormale oder verringerte Spiegel an hTERT-Genprodukten oder anormale Produkte können zu einer unzulänglichen oder anormalen Produktion von Spermatozoen führen, was zu Unfruchtbarkeit oder Funktionsstörungen hinsichtlich der Reproduktion führt. Somit stellt die Erfindung Assays (Verfahren und Reagenzien) zur Diagnose und Behandlung von auf «Telomerase-basierenden» Funktionsstörungen bezüglich der Produktion bereit. Bei einer ähnlichen Anwendung können die Assays zur Überwachung der Wirksamkeit von Empfängnisverhütungsmitteln (z.B. Empfängnisverhütungsmittel für Männer bzw. männliche Tiere) verwendet werden, die gegen die Spermaproduktion als Ziel gerichtet sind oder diese indirekt beeinflussen (und die den hTERT-Spiegel oder Telomerase-Aktivität reduzieren sollen).

Ein weiterer Aspekt der Erfindung betrifft die Bereitstellung von Assays zur Analyse der Telomerase- und hTERT-Spiegel und deren Funktion in Stammzellen, fötalen Zellen, embryonalen Zellen, aktivierten Lymphocyten und hämatopoetischen Stammzellen. Beispielsweise können Assays für den Nachweis von hTERT-Genprodukten zur allgemeinen Überwachung der Immunfunktion verwendet werden (z.B. zur Überwachung des Vorherrschens aktivierter Lymphocyten oder des gehäuferten Auftretens von Vorläufer-Stammzellen), um aktivierte Lymphocyten oder Stammzellen zu identifizieren, auszuwählen oder zu isolieren, basierend auf erhöhten hTERT-Spiegeln, und um die Wirksamkeit von therapeutischen Interventionen, die gegen diese Gewebe als Ziel gerichtet sind, zu überwachen (z.B. immunsuppressive Agenzien oder therapeutische Bemühungen, eine Stammzellpopulation zu vergrössern).

Die Erfindung stellt auch Assays zur Verfügung, die für die Identifizierung von anti-Telomerase- und anti-hTERT-Immunglobulinen (die im Serum eines Patienten gefunden werden) von Nutzen sind. Die hier beschriebenen Substanzen und Assays können zur Identifizierung von Patienten verwendet werden, in denen solche Autoimmun-Antikörper gefunden werden, was eine Diagnose und die Behandlung des mit den Immunglobulinen assoziierten Zustands erlaubt.

#### 4) Überwachung von Zellen in Kultur

Die hier beschriebenen Assays sind auch für die Überwachung der Expression von hTERT-Genprodukten und der Charakterisierung von hTERT-Genen in Zellen ex vivo oder in vitro von Nutzen. Da erhöhte hTERT-Spiegel charakteristisch für immortalisierte Zellen sind, können die erfindungsgemässen Assays beispielsweise für das Screenen nach immortalisierten Zellen oder deren Identifizierung verwendet werden oder zur Identifizierung eines Wirkstoffs, der immortalisierte Zellen durch Hemmung der hTERT-Expression oder -Funktion wieder mortalisieren kann. Beispielsweise ist dieser Assay für die Identifizierung von Zellen von Nutzen, die durch eine erhöhte Expression von hTERT in der Zelle, beispielsweise der Expression einer rekombinanten hTERT, oder durch erhöhte Expression einer endogen codierten hTERT (z.B. durch Promotoraktivierung) immortalisiert wurden.

Auf ähnliche Weise können diese Assays auch zur Überwachung der hTERT-Expression in transgenen Tieren oder Zellen (z.B. in Hefe oder menschlichen Zellen, die ein hTERT-Gen enthalten) verwendet werden. Insbesondere können die Auswirkungen von bestimmten Behandlungen (z.B. die Verabreichung eines bekannten oder vermuteten Telomerase-Antagonisten) bezüglich des hTERT-Spiegels in Menschen und nicht-menschlichen Zellen, die die erfindungsgemässe hTERT exprimieren zur Identifizierung von nützlichen Wirkstoffen und Wirkstoffkandidaten (z.B. Telomerase-Aktivität modulierende Wirkstoffe) verwendet werden.

#### B) Normale, diagnostische und prognostische Werte

Assays hinsichtlich des Vorhandenseins oder der Menge eines hTERT-Genprodukts können auf verschiedene Art und Weise ausgeführt und ebenso die Ergebnisse auf verschiedene Art und Weise interpretiert werden, was von dem Assayformat, der Natur der zu untersuchenden Probe und der erwünschten Information abhängt. Beispielsweise ist die Menge an hTERT-Genprodukten in den meisten menschlichen somatischen Geweben im Fließgleichgewicht so gering, dass diese durch bestimmte Assays nicht nachweisbar sind. Darüber hinaus ist im allgemeinen in diesen Zellen keine Telomerase-Aktivität vorhanden, so dass die Verifikation der Aktivität ziemlich leicht ist. Umgekehrt findet sich hTERT-Protein und/oder hTERT-mRNA oder Telomerase in anderen Telomerase-positiven Geweben, beispielsweise malignen Tumoren, in ausreichender Menge, so dass diese unter Verwendung der gleichen Assays nachgewiesen werden können. Selbst in jenen somatischen Zelltypen, in denen normalerweise ein geringer Spiegel an Telomerase-Aktivität nachgewiesen werden kann (z.B. Stammzellen und bestimmte aktivierte Zellen des Hämatopoetischen Systems), ist der Spiegel an hTERT-mRNA und Telomerase-Aktivität sehr gering (z.B. schätzungsweise etwa 1% oder weniger) im Vergleich zu dem Spiegel in unsterblichen Zellen; somit können unsterbliche und sterbliche Zellen mittels der erfindungsgemässen Verfahren leicht unterschieden werden. Wenn ein «weniger empfindlicher» Assay verwendet wird, kann der blosse Nachweis des hTERT-Genprodukts in einer biologischen Probe selbst für die Diagnose verwendet werden, ohne dass es erforderlich ist, eine zusätzliche Analyse durchzuführen. Zwar können die nachstehend beschriebenen Assays mit einer ausgezeichneten Empfindlichkeit ausgestattet werden, sie können darüber hinaus auch, falls erwünscht, mit einer geringeren Empfindlichkeit ausgestattet werden (z.B. durch geeignete Wahl von Puffern, Waschbedingungen, Anzahl der Amplifikationsrunden, Reagenzien und/oder Auswahl von Signalverstärkern). Somit kann im Prinzip jeder Assay so gestaltet werden, dass er hTERT-Genprodukte nur in den biologischen Proben nachweist, in denen diese in einer bestimmten Konzentration vorhanden sind, beispielsweise in einer höheren Konzentration als in gesundem oder einem anderen Kontrollgewebe. In diesem Fall wird jeder nachweisbare Spiegel an hTERT-mRNA oder hTERT-Protein als in Zellen von post-natalem menschlichem somatischem Gewebe erhöht erachtet (im Unterschied zu hämatopoetischen Zellen und anderen Stammzellen).

In einigen Fällen kann es jedoch wünschenswert sein, normale Werte oder Basiswerte (oder Bereiche) für die hTERT-Genprodukt-Expressionsspiegel zu etablieren, insbesondere, wenn sehr empfindliche Assays verwendet werden, die einen sehr geringen Spiegel an hTERT-Genprodukten, die in normalen

somatischen Zellen vorhanden sein können, nachweisen können. Normale Spiegel der Expression oder von normalen Expressionsprodukten können für jede bestimmte Population, Unterpopulation oder Gruppen von Organismen gemäss dem Fachmann gut bekannter Standardverfahren bestimmt werden. Im allgemeinen werden Basisspiegel (normale Spiegel) an hTERT-Protein oder hTERT-mRNA durch Quantifizierung der Menge an hTERT-Protein und/oder -mRNA in biologischen Proben (z.B. Flüssigkeiten, Zellen oder Geweben) bestimmt, die von normalen (gesunden) Individuen (z.B. einem Menschen) erhalten wurden. Für bestimmte Proben und Zwecke kann es erwünscht sein, die Menge eines hTERT-Genprodukts pro Zelle oder pro Tumorzelle zu quantifizieren. Um die Zellmenge einer Probe zu bestimmen, kann der Spiegel eines konstitutiv exprimierten Genprodukts oder eines anderen Genprodukts bestimmt werden, das in Zellen des Typs, von dem die Probe genommen wurde, mit bekanntem Spiegel exprimiert wird. Alternativ können normale Werte eines hTERT-Proteins oder einer hTERT-mRNA dadurch bestimmt werden, dass die Menge an hTERT-Protein/RNA in Zellen oder Geweben, von denen bekannt ist, dass sie gesund sind, und die von dem gleichen Patienten stammen, von dem die erkrankten (oder möglicherweise erkrankten) Zellen entnommen wurden, oder von einem gesunden Individuum, quantifiziert wird.

Alternativ können in einigen Fällen Basisspiegel als der Spiegel definiert werden, der in nicht-unsterblichen menschlichen somatischen Zellen in Kultur vorhanden ist. Es ist möglich, dass normale Werte (Basiswerte) zwischen verschiedenen Zelltypen etwas differieren (z.B. ist der hTERT-mRNA-Spiegel in Hoden höher als in der Niere) oder auch entsprechend dem Alter, Geschlecht oder dem physischen Zustand eines Patienten. Wenn daher beispielsweise ein Assay zur Bestimmung von Veränderungen im hTERT-Spiegel, die mit Krebs assoziiert sind, verwendet wird, können die für die Bestimmung des normalen Bereichs an hTERT-Genprodukt-Expression verwendeten Zellen von Personen des gleichen oder eines unterschiedlichen Alters stammen, je nach der Art der Untersuchung. Die Anwendung von in der Molekulargenetik verwendeten statistischen Standardverfahren erlaubt die Bestimmung von Basis-Expressionsspiegeln sowie von signifikanten Abweichungen von solchen Basisspiegeln.

Für die Durchführung der erfindungsgemässen Diagnose- und Prognose-Verfahren wie sie vorstehend beschrieben wurden kann es manchmal zweckmässig sein, sich auf «diagnostische» und «prognostische» Werte zu beziehen. Der hier verwendete Ausdruck «diagnostischer Wert» bezieht sich auf einen Wert, der für das in einer Probe nachgewiesene hTERT-Genprodukt bestimmt wurde, und der beim Vergleich mit einem normalen Bereich (oder «Basisbereich») für das hTERT-Genprodukt das Vorhandensein einer Erkrankung anzeigt. Diese Erkrankung kann durch hohe Telomerase-Aktivität gekennzeichnet sein (z.B. Krebs), das Fehlen von Telomerase-Aktivität (z.B. Unfruchtbarkeit) oder durch einen Zwischenwert.

Der Ausdruck «prognostischer Wert» bezieht sich auf eine Menge des hTERT-Genprodukts, die in einem gegebenen Zelltyp nachgewiesen wurde (z.B. einer malignen Tumorzelle) und die konsistent ist mit einer bestimmten Diagnose oder Prognose für die Erkrankung (z.B. Krebs). Die Menge des in einer Probe nachgewiesenen hTERT-Genprodukts (einschliesslich der Menge null) wird mit dem prognostischen Wert für die Zelle verglichen, so dass der relative Vergleich der Werte das Vorhandensein einer Erkrankung oder den Ausgang der Entwicklung der Erkrankung (z.B. Krebs) anzeigt. In einer Ausführungsform werden beispielsweise für die Durchführung einer Tumorphgnose Daten gesammelt, um so eine statistisch signifikante Korrelation an hTERT-Spiegel mit verschiedenen Tumorklassen oder -stadien zu erhalten. Für die gleiche Zellprobe oder Gewebeprobe, die von Individuen mit bekannten klinischen Ergebnissen stammt, wird ein prädeterminierter Bereich an hTERT-Spiegeln etabliert. Eine ausreichende Anzahl von Messungen wird durchgeführt, um so einen statistisch signifikanten Wert (oder einen Bereich von Werten) zu ermitteln, mit dem dann ein Vergleich durchgeführt wird. Der prädeterminierte Bereich von hTERT-Spiegeln oder hTERT-Aktivität für eine gegebene Zellprobe oder Gewebeprobe kann dann zur Bestimmung eines Werts oder Bereichs für den Spiegel an hTERT-Genprodukten verwendet werden, der mit einer günstigen (oder ungünstigen) Prognose (z.B. einem «niedrigen Spiegel» im Fall von Krebs) korrelieren würde. Ein «hoher Spiegel» entsprechender Bereich, der mit einer (oder mehreren) ungünstigen Prognose(n) im Fall von Krebs korreliert, kann auf ähnliche Weise bestimmt werden. Der Spiegel eines hTERT-Genprodukts einer biologischen Probe (z.B. einer Patientenprobe) kann dann bestimmt, mit den niedrigen und hohen Bereichen verglichen und zur Prognose eines klinischen Verlaufs verwendet werden.

Zwar bezieht sich die vorstehende Diskussion zur Veranschaulichung auf Krebs, diagnostische und prognostische Werte können aber auch für andere Erkrankungen (z.B. Erkrankungen bezüglich der Zellproliferation) und Zustände bestimmt werden und bei Erkrankungen oder Zuständen, bei denen es sich nicht um Krebs handelt, kann ein «hoher» Spiegel mit dem gewünschten Verlauf und ein «niedriger» Spiegel mit einem ungünstigen Verlauf korrelieren. Beispielsweise können einige Erkrankungen durch eine Defizienz (z.B. einen niedrigen Spiegel) an Telomerase-Aktivität in Stammzellen, aktivierten Lymphocyten oder Keimbahnzellen gekennzeichnet sein. In solchen Fällen können «hohe» Spiegel an hTERT-Genprodukten bezogen auf Zellen des gleichen Alters und/oder des gleichen Typs (z.B. von anderen Patienten oder anderen Geweben in einem bestimmten Patienten) mit einem günstigen Verlauf korrelieren.

Natürlich erfordern die Assayverfahren nicht unbedingt die Bestimmung von absoluten Werten an hTERT, es sei denn, es ist erwünscht, da relative Werte für viele Anwendungen der erfindungsgemässen Verfahren ausreichend sind. In den Fällen, in denen eine Quantifizierung wünschenswert ist, stellt die

vorliegende Erfindung R agenzien bereit, so dass praktisch jedes bekannte Verfahren zur Quantifizierung von Genprodukten verwendet werden kann.

Die erfindungsmässigen Assays können auch zur Beurteilung der Wirksamkeit eines bestimmten therapeutischen Behandlungsvorgehens bei Untersuchungen an Tieren, bei klinischen Tests oder bei der Überwachung der Behandlung an einzelnen Patienten verwendet werden. In diesen Fällen kann es wünschenswert sein, den Basisspiegel für den Patienten vor dem Beginn der Therapie zu etablieren und während des Verlaufs der Behandlung die Assays einmal oder öfter zu wiederholen, üblicherweise in regelmässigen Abständen, um zu überprüfen, ob sich die hTERT-Spiegel auf einen gewünschten Endpunkt hin (z.B. verringerte hTERT-Expression, wenn es sich um einen Assay für Krebs handelt) als ein Ergebnis der Behandlung bewegen.

Für den Fachmann ist es offensichtlich, dass zusätzlich zu der Quantität oder Häufigkeit von hTERT-Genprodukten auch verschiedene oder anormale Expressionsmuster (z.B. anormale Mengen von RNA-Spleiss-Varianten) oder anormale Expressionsprodukte oder Expressionsproduktvarianten, beispielsweise mutierte Transkripte, verkürzte oder «non-sense»-Polypeptide) durch Vergleich mit normalen Expressionsspiegeln und normalen Expressionsprodukten identifiziert werden können. In diesen Fällen beinhaltet die Bestimmung von «normal» oder «Basis-» die Identifizierung gesunder Organismen und/oder Gewebe (d.h. Organismen und/oder Gewebe ohne Dysregulation der hTERT-Expression oder neoplastisches Wachstum) und die Bestimmung des Expressionsspiegels von hTERT-Genproduktvarianten (z.B. Spleiss-Varianten) oder die Sequenzierung oder den Nachweis des hTERT-Gens, -mRNA oder reverser transkribierter cDNA, um so typische (normale) Sequenzvarianten zu erhalten und so zu bestimmen. Die Anwendung von Statistiken und Standardverfahren, die in der Molekulargenetik verwendet werden, erlaubt die Bestimmung von signifikanten Abweichungen von solchen Basisspiegeln.

#### C) Nachweis und Quantifizierung von TRT-Genprodukten

Wie hier betont, werden hTERT-Genprodukte normalerweise in den meisten normalen somatischen Zellen mit einem extrem niedrigen Spiegel gefunden. Beispielsweise ist die hTERT-Protein codierende mRNA in allen bisher untersuchten Telomerase-negativen Zelltypen äusserst selten oder sie fehlt. In unsterblichen Zellen, beispielsweise 293-Zellen, kann hTERT-mRNA lediglich in einer Anzahl von etwa 100 Kopien pro Zelle vorhanden sein, während normale somatische Zellen lediglich eine oder gar keine Kopie pro Zelle aufweisen. Es ist somit offensichtlich, dass es manchmal vorteilhaft sein wird, in das Assayformat Signal- oder Zielamplifikationsverfahren einzuschliessen, wenn hochempfindliche Assays für hTERT-Genprodukte erwünscht sind. Siehe beispielsweise Plenat et al., Ann. Pathol. 17 (1997), 17 (Fluoresceinyl-Tyramidsignal-Amplifikation); Zehbe et al., J. Pathol. 150 (1997), 1553 («catalyzed reporter deposition»); weitere hier aufgezählte Literaturhinweise (z.B. für bDNA-Signalamplifikation, für PCR und andere Zielamplifikationsformate), sowie weitere auf dem Fachgebiet bekannte Verfahren.

Wie bereits vorstehend angemerkt, ist es oft nicht nötig, die hTERT-mRNA oder das hTERT-Protein in den hier beschriebenen Assays zu quantifizieren, da der Nachweis eines hTERT-Genprodukts (unter Assaybedingungen, bei denen das Produkt in einer Kontrolle, beispielsweise Telomerasen negativen Zellen) nicht nachweisbar ist, an sich für eine Diagnose ausreichend ist. Bei einem weiteren Beispiel kann eine Quantifizierung überflüssig sein, nämlich dann, wenn die in einer Testprobe (z.B. Tumor) und Kontrollprobe (gesunden Zellen) gefundenen Produktspiegel direkt verglichen werden.

Falls erwünscht können die in den hier beschriebenen Assays gemessenen Mengen an hTERT-Genprodukt jedoch auf verschiedene Art und Weise beschrieben werden, was von dem Messverfahren und der Zweckmässigkeit abhängt. Somit können normale, diagnostische, prognostische, hohe oder geringe Mengen an hTERT-Protein/mRNA ausgedrückt werden als Standard-Gewichtseinheiten pro Menge einer biologischen Probe (z.B. Picogramm pro Gramm Gewebe, Picogramm pro  $10^{12}$  Zellen) als eine Anzahl von Molekülen pro Menge einer biologischen Probe (z.B. Transkripte/Zelle, Mol/Zelle), als Aktivitätseinheiten pro Zelle oder pro Menge einer anderen Einheit oder durch ähnliche Verfahren. Die Menge eines hTERT-Genprodukts kann auch in Relation zu der Menge eines anderen Moleküls ausgedrückt werden. Zu den Beispielen gehören die Anzahl von hTERT-Transkripten in einer Probe/die Anzahl von 28S rRNA-Transkripten einer Probe; Nanogramm hTERT-Protein/Nanogramm Gesamtprotein, etc.

Wenn hTERT-Genprodukte in zwei (oder mehr) unterschiedlichen Proben bestimmt werden, ist es gelegentlich zweckmässig, eine gemeinsame Vergleichsbasis für die zwei Proben zu haben. Beispielsweise können bei dem Vergleich einer Probe mit normalem Gewebe und einer Probe mit Krebsgewebe gleiche Mengen an Gewebe (bezüglich Gewicht, Volumen, Anzahl von Zellen etc.), verglichen werden. In einer alternativen Ausführungsform können Äquivalente eines Markermoleküls (z.B. 28S RNA, hTERT, Telomerase-Aktivität, Telomer-Länge, Aktin) verwendet werden. Beispielsweise kann die Menge an hTERT-Protein in einer Probe gesunden Gewebes, die 10 Picogramm 28S rRNA enthält, mit einer Probe mit erkranktem Gewebe, das die gleiche Menge an 28S rRNA enthält, verglichen werden.

Für den Fachmann ist es offensichtlich, dass praktisch jeder der hier beschriebenen Assays als ein quantitativer Assay gestaltet werden kann. Typischerweise kann zur Kalibrierung des Assays eine bekannte Menge oder Quelle eines hTERT-Genprodukts (das z.B. unter Verwendung der erfindungsgemässen Verfahren und Zusammensetzung hergestellt wurde) verwendet werden.

In bestimmten Ausführungsformen werden Assayformate ausgewählt, die die Anwesenheit, das Fehlen

len oder die Häufigkeit eines hTERT-Allels oder -Genprodukts in jeder Zelle in einer Probe (oder in einer repräsentativen Stichprobe) nachweisen können. Zu den Beispielen für solche Assayformate gehören jene, mit denen ein Signal mittels Histologie (z.B. Immunhistochemie mit Signalverstärkern oder zielverstärkenden Amplifikationsschritten) nachgewiesen werden kann, fluoreszenz-aktivierte Zellanalyse oder Zellsortierung (FACS). Diese Assayformate sind besonders dann von Vorteil, wenn man es mit einer hochheterogenen Zellpopulation zu tun hat (z.B. einer Zellpopulation, die viele unterschiedliche Zelltypen enthält, in denen nur ein Zelltyp oder nur wenige erhöhte hTERT-Spiegel auftreten oder eine Population von ähnlichen Zellen, die Telomerase mit verschiedenen Spiegeln exprimieren).

#### 10 D) Probengewinnung

Das hTERT-Gen oder -Genprodukt (d.h. mRNA oder Polypeptid) wird vorzugsweise in einer biologischen Probe nachgewiesen und/oder quantifiziert. Zu solchen Proben gehören, allerdings ohne Beschränkung darauf, Zellen (einschliesslich ganzer Zellen, Zellfraktionen, Zellextrakten und kultivierten Zellen oder Zelllinien), Gewebe (einschliesslich Blut), Blutzellen (z.B. weisse Blutzellen), Gewebeproben, beispielsweise Feinnadelbiopsieproben (z.B. von der Prostata, Brust, Schilddrüse etc.), Körperflüssigkeiten (z.B. Urin, Sputum, Amnionflüssigkeit, Blut, Peritonealflüssigkeit, Pleural-Flüssigkeit, Samen) oder daraus gewonnene Zellen (z.B. Blasen Zellen aus Urin, Lymphocyten aus Blut), Medien (von kultivierten Zellen oder Zelllinien) und Waschflüssigkeiten (z.B. von der Blase und Lunge). Zu den biologischen Proben können auch Gewebeschnitte gehören, beispielsweise Gefrierschnitte, die für histologische Zwecke entnommen wurden. Für die Diagnose und Prognose von Krebs wird eine Probe von einem kanzerösen, prokanzerösen oder vermutlich kanzerösem Gewebe oder Tumor entnommen. Es kann gelegentlich wünschenswert sein, eine biologische Probe für die spätere Analyse einzufrieren (z.B. wenn die Wirksamkeit von Behandlungen mit Wirkstoffen überwacht wird).

In einigen Fällen können die Zellen oder Gewebe vor der Analyse fraktioniert werden. Beispielsweise kann bei einer Gewebebiopsie von einem Patienten ein Zellsortierer (z.B. ein Fluoreszenz-aktiver Zellsortierer) verwendet werden, um Zellen nach Merkmalen, wie beispielsweise der Expression eines Oberflächenantigens (z.B. eines tumorspezifischen Antigens) gemäss allgemein bekannter Verfahren zu sortieren.

Zwar wird die Probe üblicherweise von einem menschlichen Patienten oder Zelllinie entnommen, die Assays können jedoch auch zum Nachweis von homologen hTERT-Genen oder entsprechenden Genprodukten in Proben von Tieren verwendet werden. Alternativ können hTERT-Gene und -Genprodukte in transgenen Tieren oder Organismen, die ein menschliches hTERT-Protein oder entsprechende Nucleinsäuresequenz exprimieren, untersucht werden.

Die Probe kann, falls nötig, durch Verdünnung in einer geeigneten Pufferlösung vorbehandelt werden oder konzentriert werden, falls dies erwünscht ist. Es kann eine Reihe von wässrigen Standardpufferlösungen bei physiologischem pH-Wert verwendet werden, wobei eine Reihe von Puffern angewandt werden kann, beispielsweise Phosphat, Tris-Puffer etc.

Der Ausdruck «biologische Probe», die von einem Patienten erhalten wurde, kann entweder als «biologische Probe» oder «Patientenprobe» bezeichnet werden. Bei einer Analyse einer «Patientenprobe» müssen nicht unbedingt Zellen oder Gewebe von dem Patienten entnommen werden. Beispielsweise können geeignet markierte hTERT-bindende Agenzien (z.B. Antikörper oder Nucleinsäuren) in den Patienten injiziert und (nach Bindung an das Ziel) unter Verwendung von Standard-Bildgebungstechniken (z.B. CAT, NMR etc.) sichtbar gemacht werden.

#### 45 E) Nucleinsäure-Assays

In einer Ausführungsform stellt die Erfindung Verfahren zum Nachweis und/oder der Quantifizierung der Expression von hTERT-mRNAs (einschliesslich Spleiss-Varianten oder Sequenzvarianten und alternative Allele) bereit. In einer alternativen Ausführungsform stellt die Erfindung Verfahren zum Nachweis und der Analyse normaler oder anormaler hTERT-Gene (oder eines Fragments davon) bereit. Zu den Formaten solcher qualitativer oder quantitativer Assays gehören, allerdings ohne Beschränkung darauf, auf Amplifikation basierende Assays mit oder ohne Signalamplifikation, auf Hybridisierung basierende Assays und auf der Kombination Amplifikation/Hybridisierung basierende Assays. Es ist für den Fachmann offensichtlich, dass die Unterscheidung zwischen Hybridisierung und Amplifikation nur aus Zweckmässigkeitsgründen durchgeführt wird: Wie in den nachstehenden Beispielen veranschaulicht, beinhalten viele Assayformate sowohl Elemente der Hybridisierung als auch Amplifikation, so dass in einigen Fällen die Kategorisierung etwas willkürlich ist.

#### 60 1) Herstellung von Nucleinsäuren

In einigen Ausführungsformen werden Nucleinsäure-Assays mit einer Nucleinsäureprobe, die aus der zu untersuchenden Zelle, oder Zelllinie oder dem zu untersuchenden Gewebe oder Organismus isoliert wurde. Die Nucleinsäure (z.B. genomische DNA, RNA oder cDNA) kann aus einer Probe gemäss einer Reihe von dem Fachmann bekannten Verfahren «isoliert» werden. In diesem Zusammenhang bezieht



sich der Ausdruck «isoliert» auf jede Abtrennung der Spezies oder des Ziels, das nachgewiesen werden soll, von jeder anderen Substanz in dem Gemisch, dies bezeichnet jedoch nicht unbedingt einen wesentlichen Reinheitsgrad des Ziels. Es ist für den Fachmann offensichtlich, dass bei dem Nachweis von Änderungen in der Kopienanzahl des hTERT-Gens das nachzuweisende Ziel genomische DNA ist. Umgekehrt ist in einem auf einer Nucleinsäure basierenden Assay RNA das nachzuweisende Ziel, wenn Expressionsspiegel eines Gens oder von Genen nachgewiesen werden sollen. In einer bevorzugten Ausführungsform ist die Nucleinsäureprobe Gesamt-mRNA (d.h. poly(A)<sup>+</sup>-RNA) in einer biologischen Probe. Verfahren zur Isolierung von Nucleinsäuren sind dem Fachmann gut bekannt und beispielsweise beschrieben in Tijssen, P. (Herausg.) in *Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology: Hybridization With Nucleic Acid Probes, Part I. Theory and Nucleic Acid Preparation*, Elsevier, N.Y. (1993), Kapitel 3, wobei dieses Dokument durch Bezugnahme als Bestandteil dieser Beschreibung anzusehen ist. In einer Ausführungsform wird Gesamt-Nucleinsäure aus einer Probe unter Verwendung eines sauren Guanidin/Phenol/Chloroform-Extraktionsverfahrens isoliert und poly(A)<sup>+</sup>-mRNA durch oligo-dT-Säulenchromatographie oder durch die Verwendung von magnetischen (dT)<sub>n</sub> Kügelchen (siehe z.B. Sambrook et al., und Ausubel et al., a.a.O.).

In alternativen Ausführungsformen ist die Isolation von Nucleinsäuren (z.B. Gesamt-RNA oder poly(A)<sup>+</sup>-RNA) aus der biologischen Probe vor der Durchführung von Amplifikation, Hybridisierung oder anderen Assays nicht erforderlich. Diese Ausführungsformen haben bestimmte Vorteile im Fall, dass hTERT-RNA gemessen werden soll, da sie die Wahrscheinlichkeit verringern, dass hTERT-mRNA während der Isolation und der Handhabung verlorengeht. Beispielsweise können viele Amplifikationsverfahren, wie beispielsweise PCR und RT-PCR (reverse Transkriptase-PCR) unter Verwendung permeabilisierter Zellen (histologische Proben und FACS-Analysen) lysierter Gesamtzellen oder hoher Zellfraktionen, wie beispielsweise bestimmter Zellextrakte, durchgeführt werden. Vorzugsweise werden Schritte unternommen, um die Integrität der Zielnucleinsäure (z.B. mRNA), falls erforderlich, zu bewahren (z.B. durch Zugabe von RNAase-Inhibitoren). Amplifikations- und Hybridisierungs-Assays können auch in situ durchgeführt werden, beispielsweise in dünnen Gewebeabschnitten einer Biopsieprobe oder einer einlagigen Zellschicht (z.B. Blutzellen oder von einander getrennte Zellen einer Gewebekultur). Die Amplifikation kann auch in intakten ganzen Zellen oder fixierten Zellen durchgeführt werden. Beispielsweise können PCR-, RT-PCR-, oder LCR-Amplifikationsverfahren, so wie dies auf dem Fachgebiet bekannt ist, in situ durchgeführt werden, beispielsweise unter Verwendung einer Polymerase oder Ligase, eines Primers oder von Primern und (Desoxy)-Ribonucleosid-Triphosphaten (wenn eine Polymerase verwendet wird) und reverser Transkriptase und einem Primer (wenn RNA transkribiert und die cDNA nachgewiesen werden soll) an fixierten, permeabilisierten oder mikroinjizierten Zellen, um so die Ziel-hTERT-RNA oder -DNA zu amplifizieren. hTERT-RNA enthaltende Zellen (z.B. Telomerase-positive Zellen) oder eine gewünschte hTERT-DNA-Sequenz können dann nachgewiesen werden. Dieses Verfahren ist oft dann zweckmässig, wenn Fluoreszenz-markierte dNTPs, Primer oder andere Bestandteile in Verbindung mit Mikroskopie, einer FACS-Analyse oder äquivalenten Verfahren verwendet werden.

## 2) Auf Amplifikation basierende Assays

In einer Ausführungsform sind die erfindungsgemässen Assays zum Nachweis eines hTERT-Gens oder -Genprodukts auf Amplifikation basierende Assays. In einem auf Amplifikation basierenden Assay wird ein gesamtes hTERT-Gen oder -Transkript oder ein Teil davon (z.B. mRNA oder cDNA, nachstehend als «Ziel» bezeichnet) amplifiziert und das amplifizierte Produkt wird anschliessend direkt oder indirekt nachgewiesen. Falls kein Gen oder Genprodukt vorhanden ist, das als Matrice wirken kann, wird kein Amplifikationsprodukt hergestellt (z.B. mit der erwarteten Grösse) oder die Amplifikation ist unspezifisch und es entsteht üblicherweise kein einzelnes Amplifikationsprodukt. Im Gegensatz dazu wird die Zielsequenz amplifiziert, wenn das fragliche Gen oder Genprodukt vorhanden ist, was somit die Anwesenheit und/oder die Menge an entsprechendem Gen oder an entsprechender mRNA anzeigt. Auf Amplifikation basierende Assays sind dem Fachmann gut bekannt.

Die vorliegende Erfindung stellt eine grosse Vielzahl an Primern und Sonden zum Nachweis von hTERT-Genen und Genprodukten bereit. Solche Primer und Proben sind zu dem hTERT-Gen oder Genprodukt ausreichend komplementär, um an die Zielnucleinsäure hybridisieren zu können. Primer weisen üblicherweise eine Länge von mindestens 6 Basen auf, vorzugsweise von etwa 10 bis etwa 100 Basen, mehr bevorzugt von etwa 12 bis etwa 50 Basen und am meisten bevorzugt zwischen etwa 14 und etwa 25 Basen. Der Fachmann wird nach Lesen dieser Beschreibung in der Lage sein, unter Verwendung von Routineverfahren Primer auszuwählen, mit denen das gesamte hTERT-Gen oder -Genprodukt oder ein Anteil davon amplifiziert werden kann oder mit denen zwischen Genprodukt-Varianten, hTERT-Allelen etc. unterschieden werden kann. In Tabelle 2 sind Beispiele von Primern aufgezählt, die für eine PCR-Amplifikation der hTERT oder spezifischer hTERT-Genprodukte oder -Bereiche von Nutzen sind. Es ist auf dem Fachgebiet bekannt, dass einzelne Oligomere (siehe beispielsweise US-Patent Nr. 5 545 522) «nested sets» von Oligomeren oder sogar ein Pool von degenerierten Oligomeren für die Amplifikation verwendet werden kann, beispielsweise, wie dies für die nachstehend beschriebene Amplifikation der Tetrahymena TRT-cDNA veranschaulicht wird.

Die Erfindung stellt eine Vielzahl von Verfahren zur Amplifikation und zum Nachweis eines hTERT-

Gens oder -Genprodukts bereit. Dazu gehören die Polymerase-Kettenreaktion (einschliesslich aller Varianten, beispielsweise die Reverse-Transkriptase-PCR; das «Sunris Amplification System» (Oncor, Inc., Gaithersburg MD) und zahlreiche weitere auf dem Fachgebiet bekannte Verfahren. In einer veranschaulichenden Ausführung wird die PCR-Amplifikation in einer Lösung von 50 µl durchgeführt, die die Nucleinsäureprobe enthält (z.B. eine durch reverse Transkription von hTERT-RNA erhaltene cDNA), jeweils 100 µM dNTP (dATP, dCTP, dGTP und dTTP; Pharmacia LKB Biotechnology, NJ) der (die) hTERT-spezifischen PCR-Primer, 1 Einheit Taq-Polymerase (Perkin Elmer, Norwalk CT), 1 × PCR-Puffer (50 mM KCl, 10 mM Tris, pH-Wert 8,3 bei Raumtemperatur, 1,5 mM MgCl<sub>2</sub> und 0,01% Gelatine), wobei die Amplifikation mit etwa 30 Cyclen durchgeführt wird, jeweils 45 Sekunden bei 94°C, 45 Sekunden bei 45°C und 90 Sekunden bei 72°C. Es können jedoch natürlich für bestimmte Reaktionen zur Optimierung der PCR-Amplifikation zahlreiche Variationen eingeführt werden.

Zu weiteren geeigneten Zielamplifikationsverfahren gehören die Ligase-Kettenreaktion (LCR) (siehe z.B. Wu und Wallace, *Genomics* 4 (1989), 560; Landegren et al., *Science* 241 (1988), 1077; Barany, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88 (1991), 189 und Barringer et al., *Gene* 89 (1990), 117), die Strangverdrängungs-Amplifikation (SDA) (siehe z.B. Walter et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89 (1992) 392–396); die Transkriptions-Amplifikation (siehe z.B. Kwoh et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86 (1989), 1173), «self-sustained-sequence»-Replikation (3SR) (siehe z.B. Fahyet et al., *PCR Methods Appl.* 1 (1992) 2 und Guatelli et al., *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 87 (1990) 1874); die Nucleinsäuresequenz basierte Amplifikation (NASBA, Cangene, Mississauga, Ontario; siehe z.B. Compton, *Nature* 350 (1991) 91); das Transkriptions-basierte Amplifikationssystem (TAS); und das «self-sustained-sequence»-Replikationssystem (SSR). Jede der vorstehenden Veröffentlichungen ist aufgrund der Bezugnahme als Bestandteil dieser Beschreibung anzusehen. Eine zweckmässige PCR-Variante ist der PCR-ELISA (z.B. Boehringer Mannheim Kat. Nr. 1 636 111), wobei Digoxigenin-dUTP in das PCR-Produkt eingebaut wird. Das PCR-Reaktionsgemisch wird denaturiert und mit einem Biotin-markierten Oligonucleotid hybridisiert, das so entworfen wurde, dass es an eine interne Sequenz des PCR-Produkts binden kann. Die Hybridisierungsprodukte werden an mit Streptavidin in überzogenen Trägern immobilisiert und unter Verwendung von anti-Digoxigenin-Antikörpern nachgewiesen. Beispiele für in vitro-Amplifikationsverfahren, die dem Fachmann ausreichend Anleitung geben, können in folgenden Veröffentlichungen gefunden werden: *PCR Technology: Principles and Applications for DNA Amplification*, H. Erlich (Herausg.) Freeman Press, New York, NY (1992); *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*, Herausg. Innis, Gelfand, Sninsky, und White, Academic Press, San Diego, CA (1990); Mattila et al., *Nucleic Acids Res.* 19 (1991), 4967; Eckert und Kunkel, *PCR Methods and Applications* 1 (1991), 17; *PCR*, Herausg. McPherson, Quirk und Taylor, IRL Press, Oxford; U.S. Patent Nr. 4 683 195, 4 683 202 und 4 965 188; Barringer et al., *Gene* 89 (1990), 117; Kwoh et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86 (1989), 1173; Guatelli et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87 (1990) 1874; Lomell et al., *J. Clin. Chem.* 35 (1989), 1826. Jedes dieser Dokumente ist durch Bezugnahme als Bestandteil dieser Beschreibung anzusehen.

Amplifizierte Produkte können direkt analysiert werden (z.B. anhand der durch Gelelektrophorese bestimmten Grösse), durch Hybridisierung an einer Zielnucleinsäure, die an einem festen Träger immobilisiert ist, beispielsweise einem Kügelchen, einer Membran, einer Scheibe oder einem Chip; durch Sequenzierung; immunologisch (z.B. durch PCR-ELISA), durch Nachweis eines fluoreszierenden phosphoreszierenden oder radioaktiven Signals oder durch eine Reihe weiterer allgemein bekannter Massnahmen. In einem veranschaulichenden Beispiel für ein Nachweisverfahren werden beispielsweise PCR-Primer verwendet, die mit Hilfe von Haarnadelschleifen («hairpin loops») vergrössert wurden, die mit Fluorescein verknüpft sind und einem Benzoesäure-Derivat, das als quenchende Verbindung dient, so dass nur dann eine Fluoreszenz emittiert wird, wenn sich die Primer zur Bindung ihrer Ziele entfalten und Replikation stattfindet.

Da hTERT-mRNA normalerweise als ein äusserst seltenes Transkript exprimiert wird, das selbst in Telomerasepositiven Zellen nur in sehr niedrigen Konzentrationen vorhanden ist, ist es oft wünschenswert, das durch einen Amplifikationsschritt erhaltene Signal zu optimieren oder zu verstärken. Eine Möglichkeit dafür besteht in der Erhöhung der Anzahl von Amplifikationszyklen. Beispielsweise sind zwar 20 bis 25 Cyclen für die Amplifikation der meisten mRNAs mittels der Polymerasekettenreaktion unter Standardreaktionsbedingungen ausreichend, der Nachweis von hTERT-mRNA kann jedoch in vielen Proben in Abhängigkeit von dem Nachweisformat 30 bis 35 Amplifikationszyklen benötigen. Durch sorgfältige Auswahl der Amplifikationsbedingung einschliesslich der Anzahl von Amplifikationszyklen kann ein Assay entworfen werden, der nur dann zu einem Amplifikationsprodukt führt, wenn eine Schwellenwertmenge des Ziels in der Testprobe vorhanden ist (d.h. so dass nur Proben mit einem hohen Spiegel an hTERT-mRNA ein «positives» Ergebnis zeigen). Darüber hinaus sind Verfahren bekannt, um das durch Amplifikation der Zielsequenz erzeugte Signal zu verstärken. Zu den Verfahren zur Verbesserung der Fähigkeit ein amplifiziertes Ziel nachzuweisen, gehören Signalamplifikationssysteme, beispielsweise: Signalamplifikation mit verzweigter DNA «branched DNA signal amplification» (s. z.B. US-Patent Nr. 5 124 246 und Urdea, *Bio/Tech.* 12 (1994), 926); das «tyramide»-Signalamplifikationssystem (TSA, DuPont); Amplifikation mit einem katalytischen Signal («catalytic signal amplification» (CSA) (Dako); Q Beta-Replicase-Systeme (Tyagi et al., *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 93 (1996), 5395) etc.

Es ist für den Fachmann offensichtlich, dass unabhängig von dem verwendeten Amplifikationsverfahren eine Vielzahl von auf dem Fachgebiet bekannten quantitativen Verfahren zur Quantifizierung ver-

wendet werden kann, falls dies erwünscht ist. Beispielsweise können, falls erwünscht, zwei oder mehr Polynucleotide in einer einzigen Probe gemeinsam amplifiziert werden. Dieses Verfahren kann als ein zweckmäßiges Verfahren zur Quantifizierung der hTERT-mRNA-Menge in einer Probe verwendet werden, da sowohl die reverse Transkription als auch Amplifikationsreaktionen im gleichen Reaktionsgemisch für ein Ziel- und Kontroll-Polynucleotid durchgeführt werden. Die gemeinsame Amplifikation mit dem Kontrollpolynucleotid (das normalerweise in einer bekannten Konzentration oder einer bekannten Kopienanzahl vorhanden ist) kann zur Normalisierung der Anzahl von Zellen in der Probe im Vergleich zu der Menge an hTERT in der Probe verwendet werden. Zu den geeigneten Kontroll-Polynucleotiden für Coamplifikationsreaktionen gehören DNA von «housekeeping»-Genen exprimierte RNA, konstitutiv exprimierte Gene und in vitro synthetisierte RNAs oder DNAs, die zu dem Reaktionsgemisch gegeben werden. Zu den endogenen Kontroll-Polynucleotiden zählen solche, die bereits in der Probe vorhanden sind, während exogene Kontroll-Polynucleotide einer Probe zugegeben werden, wodurch eine Reaktion «mit Schuss» («spiked») erzeugt wird. Zu den Beispielen für Kontroll-RNAs zählen  $\beta$ -Actin-RNA, GAPDH RNA, snRNAs, hTR und endogen exprimierte 28S rRNA (siehe Khan et al., *Neuro sci. Lett.* 147 (1992), 114. Zu exogenen Kontroll-Polynucleotiden gehören eine synthetische AW106-cRNA, die von pAW106 als «sense»-Strang mittels T7-Polymerase synthetisiert werden kann. Damit das Coamplifikationsverfahren für eine Quantifizierung verwendet werden kann, müssen sowohl die Kontroll-Nucleotide als auch die Ziel-Polynucleotide üblicherweise in einem linearen Bereich amplifiziert werden. Ausführliche Protokolle für eine quantitative PCR können gefunden werden in PCR Protocols, A Guide to Methods and Applications, Innis et al., Academic Press, Inc. N.Y. (1990) und Ausubel et al., a.a.O. (Einheit 15) und Diaco, R. (1995) Practical Considerations for the Design of Quantitative PCR Assays, in PCR Strategies, S. 84–108, Innis et al. Herausg. Academic Press, New York.

In Abhängigkeit von der Sequenz des endogenen oder exogenen Standards können unterschiedliche Primersätze für die Coamplifikationsreaktion verwendet werden. Bei einem Verfahren, der sogenannten kompetitiven Amplifikation, beinhaltet die quantitative PCR die gleichzeitige Coamplifikation mit einer bekannten Menge einer Kontrollsequenz, wobei die gleichen Primer, die für die Zielnucleinsäure verwendet werden, benutzt werden (ein Paar mit zwei Primern). In einer alternativen Ausführungsform, die als nicht-kompetitive Amplifikation bekannt ist, werden die Kontrollsequenz und die Zielsequenz (z.B. hTERT-cDNA) unter Verwendung unterschiedlicher Primer (d.h. 2 Paare von 2 Primern) amplifiziert. In einer weiteren alternativen Ausführungsform, der sogenannten semi-kompetitiven Amplifikation, werden drei Primer verwendet, wobei einer hTERT-spezifisch, einer kontroll-spezifisch und einer in der Lage ist, sich sowohl an Zielsequenzen als auch Kontrollsequenzen anzulagern. Semi-kompetitive Amplifikation wird in dem US-Patent Nr. 5' 629 154 beschrieben, das hiermit durch Bezugnahme als Bestandteil dieser Beschreibung angesehen werden kann.

### 3) Auf Hybridisierung basierende Assays

#### a) Allgemeines

Eine Vielzahl von Verfahren für die spezifische Messung von DNA und RNA mit Hilfe von Nucleinsäure-Hybridisierungsverfahren sind dem Fachmann bekannt (siehe Sambrook et al., a.a.O.). Auf Hybridisierung basierende Assays betreffen Assays, bei denen eine Nucleinsäuresonde an eine Zielnucleinsäure hybridisiert wird. Üblicherweise sind die erfindungsgemässen Nucleinsäure-Hybridisierungssonden vollständig oder im wesentlichen identisch zu einer zusammenhängenden Sequenz des hTERT-Gens oder der entsprechenden RNA-Sequenz. Vorzugsweise sind die Nucleinsäuresonden mindestens etwa 10 Basen lang, mehr bevorzugt mindestens etwa 20 Basen und am meisten bevorzugt etwa 200 Basen oder länger. Verfahren zur Auswahl von Nucleinsäuresondensequenzen zur Verwendung bei der Nucleinsäurehybridisierung werden in Sambrook et al., a.a.O. diskutiert. In einigen Formaten sind entweder das Ziel oder die Sonde oder beide immobilisiert. Bei der immobilisierten Nucleinsäure kann es sich um eine DNA, RNA oder ein anderes Oligo- oder Polynucleotid handeln. Diese können natürlich oder nicht natürlich vorkommende Nucleotide, Nucleotidanaloga oder Rückgrate umfassen. Solche Assays können in verschiedenen Formaten verwendet werden, beispielsweise: Southern, Northern «dot» und «slot» Blots, Polynucleotid- oder Oligonucleotid-Arrays mit hoher Dichte (z.B. GeneChips/Affymetrix), Messstäbchen, Messnadeln («pins»), Chips oder Kügelchen. All diese Verfahren sind auf dem Fachgebiet allgemein bekannt und sie stellen die Basis vieler im Handel erhältlicher diagnostischer Kits dar. Hybridisierungstechniken werden allgemein beschrieben in Hames et al., Herausg. Nucleic Acid Hybridization, A Practical Approach IRL Press (1985); Gall und Pardue, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 63 (1969), 378–383 und John et al., *Nature*, 223 (1969) 582–587.

Dem Fachmann sind eine Vielzahl von Formaten für die Nucleinsäurehybridisierung bekannt. Beispielsweise stellt die direkte Hybridisierung ein übliches Format dar, wobei eine Zielnucleinsäure mit einer markierten komplementären Sonde hybridisiert wird. Gewöhnlich werden markierte Nucleinsäuren für die Hybridisierung verwendet, wobei die Markierung das nachweisbare Signal liefert. Ein Verfahren zur Beurteilung der Anwesenheit, des Fehlens oder der Menge an hTERT-mRNA besteht in der Durchführung eines Northern-Transfers von RNA aus einer Probe und der Hybridisierung mit einer markierten hTERT-spezifischen Nucleinsäuresonde, so wie dies in Beispiel 2 veranschaulicht ist. Wie bereits vorste-

hend angemerkt, ist hTERT-mRNA, wenn überhaupt, in den meisten Zellen nur in sehr geringen Mengen vorhanden. Somit ist es bei der Verwendung einer Northern-Hybridisierung oft wünschenswert, einen Amplifikationsschritt oder alternativ grosse Mengen an Ausgangs-RNA zu verwenden. Ein zweckmässiges Verfahren zur Beurteilung der Anwesenheit, des Fehlens oder der Menge von hTERT-Proteine codierender DNA in einer Probe umfasst einen Southern-Transfer von DNA aus einer Probe und die Hybridisierung mit einer markierten hTERT-spezifischen Nucleinsäuresonde.

Zu weiteren üblichen Hybridisierungsformaten gehören «Sandwich»-Assays und Kompetitions- oder Verdrängungs-Assays. Bei den «Sandwich»-Assays handelt es sich um im Handel erhältliche zweckmässige Hybridisierungsassays zum Nachweis und zur Isolierung von Nucleinsäuresequenzen. In solchen Assays werden eine «Einfang»-Nucleinsäure, die kovalent an einen festen Träger immobilisiert ist, und eine markierte «Signal»-Nucleinsäure in Lösung verwendet. Die biologische oder klinische Probe liefert die Zielnucleinsäure. Die «Einfang»-Nucleinsäure- und die «Signal»-Nucleinsäuresonde hybridisieren mit der Zielnucleinsäure, wobei ein «Sandwich»-Hybridisierungskomplex gebildet wird. Für die Wirksamkeit ist es erforderlich, dass die Signalnucleinsäure mit der «Einfang»-Nucleinsäure hybridisieren kann.

#### b) Auf einem Chip und auf einer Scheibe basierende Assays

Die vorliegende Erfindung stellt ferner auf einer Sonde basierende Hybridisierungsassays für hTERT-Genprodukte bereit, wobei Arrays von immobilisierten Oligonucleotiden oder Oligonucleotiden verwendet werden, an die eine hTERT-Nucleinsäure hybridisieren kann (d.h. an einige, jedoch normalerweise nicht an alle, oder nicht einmal an die meisten der immobilisierten Oligo- oder Polynucleotide). Oligonucleotid-Arrays mit hoher Dichte oder Polynucleotid-Arrays stellen ein Mittel für den effizienten Nachweis des Vorhandenseins und der Merkmale (z.B. der Sequenz) einer Zielnucleinsäure (z.B. ein hTERT-Gen, -mRNA oder -cDNA) dar. Es sind Techniken bekannt, mit denen sich Arrays herstellen lassen, die Tausende von zu definierten Sequenzen komplementäre Oligonucleotide an definierten Positionen auf einer Oberfläche enthalten, wobei für die Synthese in situ photolithographische Verfahren verwendet werden (siehe z.B. US-Patent Nr. 5 578 832, 5 556 752 und 5 510 270; Fodor et al., Science 251 (1991), 767; Pease et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91 (1994), 5022 und Lockhart et al., Nature Biotech 14 (1996), 1675) oder andere Verfahren zur schnellen Synthese und Anlagerung von definierten Oligonucleotiden (Blanchard et al., Biosensors & Bioelectronics 11 (1996), 687). Bei Anwendung dieser Verfahren werden Oligonucleotide (z.B. 20-mere) mit bekannter Sequenz direkt auf einer Oberfläche, beispielsweise auf einer Scheibe mit derivatisiertem Glas synthetisiert. Normalerweise ist das hergestellte Array redundant mit einigen Oligonucleotidsonden auf dem Chip, die für das nachzuweisende hTERT-Polynucleotid spezifisch sind.

Kombinationen von Oligonucleotidsonden können so entworfen werden, dass alternativ gespleissste mRNAs nachgewiesen werden können oder um festzustellen, welches von verschiedenen hTERT-Allelen in einer bestimmten Probe exprimiert wird.

In einer veranschaulichenden Ausführungsform wird durch reverse Transkription von Gesamt-RNA von einer Testzelle präparierte cDNA amplifiziert (z.B. mittels PCR). Normalerweise ist das amplifizierte Produkt markiert, beispielsweise durch Einbau eines fluoreszenzmarkierten dNTPs. Die markierten cDNAs werden dann mit einem Chip hybridisiert, der Oligonucleotidsonden umfasst, die zu verschiedenen Untersequenzen des hTERT-Gens komplementär sind. Die Hybridisierungspositionen werden bestimmt (z.B. gemäss den allgemeinen Verfahren von Shalon et al., Genome Research 6 (1996), 639 oder Schena et al., Genome Res. 6 (1996) 639) und aus dem Hybridisierungsmuster die Sequenz (oder eine andere Information) durch auf diesem Fachgebiet gut bekannte Verfahren abgeleitet.

In einer Ausführungsform werden zwei cDNA-Proben mit dem gleichen Chip hybridisiert, wobei jede mit einer unterschiedlichen Fluoreszenzgruppe markiert ist. Das Verhältnis der Hybridisierung jeder markierten Probe zu Stellen, die komplementär zu dem hTERT-Gen sind, wird dann untersucht. Falls beide Proben die gleiche Menge an hTERT-mRNA enthalten, beträgt das Verhältnis der beiden Fluoreszenzsignale 1:1. Dabei muss das Signal der Fluoreszenzen nicht so eingestellt werden, dass jedem Unterschied in der molaren Empfindlichkeit der Fluoreszenzsignale Rechnung getragen wird.

Im Gegensatz dazu wird das in der zweiten Probe verwendete Fluoreszenzsignal vorherrschen, falls die erste Probe von einem gesunden (oder Kontroll)-Gewebe stammt, und die zweite Probe von einem kanzerösen Gewebe.

#### c) In situ-Hybridisierung

Ein alternatives Verfahren zum Nachweis der Expression eines ein hTERT-Protein codierenden Gens ist in situ-Hybridisierung. In situ-Hybridisierungsassays sind gut bekannt und allgemein beschrieben in Angerer et al., Methods Enzymol. 152 (1987), 649–660 und Ausubel et al., a.a.O. In einem in situ-Hybridisierungsassay sind Zellen oder Gewebeproben an einem festen Träger fixiert, der sich typischerweise in einem permeabilisierten Zustand befindet, typischerweise auf einer Glasscheibe. Die Zellen werden dann mit einer Hybridisierungslösung bei einer moderaten Temperatur hybridisiert, um so die Anlagerung von markierten Nucleinsäuresonden zu gestatten (z.B. <sup>35</sup>S-markierte Ribosonden, Fluoreszenz-

markierte Sonden), die komplementär oder im wesentlichen komplementär zu hTERT sind. Freie Sonde wird durch Waschen und/oder Spaltung mit Nucleas entfernt und die gebundene Sonde wird direkt auf der Scheibe durch Autoradiographie oder ein geeignetes bildgebendes Verfahren, sowie dies auf dem Fachgebiet bekannt ist, sichtbar gemacht.

#### 4) Spezifischer Nachweis von Varianten

Wie bereits vorstehend angemerkt und in den Beispielen (z.B. Beispiel 9) veranschaulicht, können Amplifikations-Primer oder -Sonden ausgewählt werden, um Amplifikationsprodukte zu liefern, die spezifische Deletion, Verkürzungen und Insertionen umspannen, wodurch der Nachweis von spezifischen Varianten oder Anomalitäten in der hTERT-mRNA erleichtert wird. Ein Beispiel eines Genprodukts einer hTERT-Variante, das nachgewiesen werden kann, ist eine hTERT-RNA, wie beispielsweise ein vorstehend und in Beispiel 9 beschriebenes Produkt (SEQ. ID. Nr. 4). Die biologische Funktion der 182-Variante(n) ist nicht bekannt, falls überhaupt eine vorhanden ist. Das von der Variante vermutlich codierte verkürzte hTERT-Protein könnte jedoch an einer Regulation von Telomerase-Aktivität beteiligt sein, beispielsweise durch Assemblierung eines nicht-funktionellen Telomerase-RNPs, der Telomerase-Bestandteile titriert. Alternativ könnte eine negative Regulation von Telomerase-Aktivität durch Steuerung der hTERT-prä-mRNA (naszierende mRNA) auf eine Weise erzielt werden, die zu einer Eliminierung der mRNA und der Herabsetzung des hTERT-mRNA-Spiegels führt. Aus diesen und weiteren Gründen ist die Möglichkeit 182-Varianten entdecken zu können von Nutzen. Zusätzlich mag es gelegentlich wünschenswert sein, in Proben, in denen zwei Spezies von hTERT-RNA vorhanden sind (z.B. eine 182-hTERT-RNA und eine das hTERT-Protein mit vollständiger Länge codierende hTERT-RNA), deren relative und/oder absolute Häufigkeit zu vergleichen.

Die Erfindung stellt eine Vielzahl von Verfahren zum Nachweis von 182-Varianten bereit. Beispielsweise führt eine Amplifikation unter Verwendung von Primerpaaren, die die 182-Basenpaardeletion umspannen, zu Produkten unterschiedlicher Grösse, die den deletierten und undeletierten hTERT-RNAs (falls beide vorhanden sind) entsprechen und diese können auf Grund ihrer Grösse (z.B. durch Gelelektrophorese) unterschieden werden. Zu den Beispielen für Primerpaare, die zur Amplifikation des Bereichs der die 182 bp-Deletion umspannt, nützlich sind, gehören TCP1.14 und TCP1.15 (Primersatz 1) oder TCP1.25 und bTCP6 (Primersatz 2) (siehe Tabelle 2). Diese Primerpaare können getrennt verwendet werden oder in einem PCR-Experiment mit «nested»-Primern, wobei der Primersatz 1 zuerst benutzt wird. Es ist für den Fachmann auch offensichtlich, dass Hybridisierungsverfahren (z.B. Northern-Hybridisierung) oder RNase-Schutzassays zum Nachweis von hTERT-RNA-Varianten oder um solche Varianten unterscheiden zu können, unter Verwendung der erfindungsgemässen hTERTNucleinsäuresonde verwendet werden können.

Ein weiteres geeignetes Verfahren umfasst PCR-Amplifikation (oder ein äquivalentes Verfahren) mit drei Primern. Ein Primer ist spezifisch zu jeder hTERT-RNA-Spezies (z.B. wie in Tabelle 4 veranschaulicht) und ein Primer ist komplementär zu beiden Spezies (z.B. TCP1.25 (2270–2288)) – analog zu dem semi-kompetitiven quantitativen PCR-Verfahren, das ausführlicher vorstehend beschrieben ist. Ein Beispiel eines Primers, der spezifisch zu SEQ. ID. Nr. 1 ist, ist ein Primer, der sich innerhalb der Sequenz von 182 Nucleotiden (d.h. Nucleotide 2345 bis 2526 von SEQ. ID. Nr. 1) anlagert, z.B. TCP1.73 (2465–2445). Ein Primer, der zu SEQ. ID. Nr. 4 (eine  $\Delta$ 182-Variante) spezifisch ist, ist beispielsweise ein Primer, der an die Nucleotide 2358–2339 von SEQ. ID. Nr. 4 anlagert (d.h. der Stelle, die der Insertion von 182 Nucleotiden in SEQ. ID. Nr. 1 entspricht). Die absolute Häufigkeit der  $\Delta$ 182-hTERT-mRNA-Spezies oder deren relative Häufigkeit im Vergleich zu der Spezies, die das hTERT-Protein mit vollständiger Länge codiert, kann bezüglich einer Korrelation mit dem Zellstatus (z.B. der Fähigkeit zur unbegrenzten Proliferation) analysiert werden. Zahlreiche weitere Primer können ausgehend von der vorliegenden Beschreibung ausgewählt werden.

## TABELLE 4

## BEISPIELE FÜR PRIMER

182-Spezies (z.B. SEQ. ID. Nr. 4) spezifischer Primer:

5'-GGCACTGGACGTAGGACGTG-3

hTRT (SEQ. ID. Nr. 1) spezifischer Primer (TCP1.73):

5'-CACTGCTGGCCTCATTCAAGG-3

Gemeinsamer (vorwärts)-Primer (TCP1.25):

5'-TACTGCGTGCGTCGGTATG-3

Zu der weiteren hTRT-Genen von Varianten oder den entsprechenden Genprodukten, die nachgewiesen werden können, gehören solche, die durch Codons, die zu einem vorzeitigen Stop führen, Deletionen, Substitutionen oder Insertionen charakterisiert sind. Deletionen können anhand der verringerten Grösse des Gens, des mRNA-Transkripts oder der cDNA nachgewiesen werden. Auf ähnliche Weise können Insertionen anhand der gesteigerten Grösse des Gens, des mRNA-Transkripts oder der cDNA nachgewiesen werden. Insertionen und Deletionen können auch eine Verschiebung des Leserahmens hervorrufen, was zur Entstehung von Codons für einen frühzeitigen Stop oder längerer offener Leserahmen führt. Substitutionen können durch Hybridisierung mit einer Sonde nachgewiesen werden. Diese Veränderungen werden dadurch nachgewiesen, dass Veränderungen der Grösse der hTRT-Polypeptid-Variante untersucht werden (z.B. durch Western-Analyse) oder durch Hybridisierung oder spezifische Amplifikation, je nach dem, wie es zweckmässig erscheint. Alternativ können Mutationen durch Sequenzierung des Gens oder des Genprodukts gemäss Standardverfahren bestimmt werden. Darüber hinaus und wie bereits vorstehend angemerkt, können Amplifikationsassays und Hybridisierungssonden ausgewählt werden, um auf bestimmte Anormalitäten spezifisch abzielen zu können. Beispielsweise können Nucleinsäuresonden oder Amplifikationsprimer ausgewählt werden, die spezifisch mit der Region hybridisieren, die die Deletion, Substitution oder Insertion enthält bzw. diese spezifisch amplifiziert. An der Stelle, wo das hTRT-Gen eine solche Mutation enthält (1) hybridisiert die Sonde entweder nicht, oder die Amplifikationsreaktion liefert keine spezifische Amplifikation oder wird zu einer Veränderung der Grösse des Amplifikationsprodukts oder des Hybridisierungssignals führen; oder (2) die Sonde oder Amplifikationsreaktion umfasst die gesamte Deletion oder beide Enden der Deletion (Deletionsverbindungs-punkt) oder (3) ähnlicherweise können Sonden und Amplifikationsprimer ausgewählt werden, die spezifisch auf Punktmutationen oder Insertionen abzielen.

#### 5) Nachweis von HTRT-Mutantenallelen

Mutationen im hTRT-Gen könnten für die Entstehung einer Erkrankung verantwortlich sein oder könnten zu einem Krankheitszustand beitragen. Veränderungen der genomischen DNA von hTRT könnten die Spiegel der Gentranskription beeinflussen, zu Veränderungen von Aminosäureresten im hTRT-Protein führen, dazu führen, dass verkürzte hTRT-Polypeptide hergestellt werden, die Prozessierungswege der prä-mRNA ändern (was die hTRT-mRNA-Spiegel verändern kann) und auch weitere Konsequenzen zur Folge haben.

Änderungen der genomischen DNA in Nicht-hTRT-Loci können auch die Expression von hTRT oder Telomerase durch Veränderung der Enzyme oder zellulären Prozesse beeinflussen, die für die Regulation der Expression von hTRT, hTR und Telomerase-assoziierten Proteinen verantwortlich sind, sowie für die Prozessierung und die RNP-Assemblierung und den Transport. Änderungen, die die hTRT-Expression, die Prozessierung oder RNP-Assemblierung betreffen, könnten auch für den Verlauf einer Krebserkrankung, für Alterserkrankungen, für Krankheiten hinsichtlich eines DNA-Schadens etc. wichtig sein.

Der Nachweis von Mutationen in hTRT-mRNA oder dem entsprechenden Gen und Genkontrollelementen kann auf vielfältige Weise gemäss den hier beschriebenen Verfahren durchgeführt werden. Dazu gehören folgende veranschaulichende Beispiele: Es kann ein Verfahren, das als «Primer-Screening» bezeichnet wird, verwendet werden; es werden PCR-Primer entworfen, deren 3'-Enden sich an Nucleotide in einer Proben-DNA (oder RNA), die möglicherweise mutiert sind, anlagern. Falls die DNA (oder RNA) durch die Primer amplifiziert wird, paaren die 3'-Enden mit den Nucleotiden im Gen, falls die DNA nicht amplifiziert wird, dann paaren entweder eines oder beide Enden nicht mit den Nucleotiden im Gen, was die Anwesenheit einer Mutation anzeigt. Auf ähnliche Weise können Primer so entworfen werden, dass Punktmutationen unter Verwendung der Ligase-Kettenreaktion (LCR, vorstehend

beschrieben) nachgewiesen werden können. Eine weitere Technik, die bei dem vorliegenden Verfahren angewandt werden kann, basiert auf Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus, RFLP (Pourzand, C., Cerutti, P. *Mutat. Res.* 288 (1993), 113–121). Dabei wird ein Southern-Blot menschlicher genomischer DNA, die mit verschiedenen Restriktionsenzymen gespalten wurde, mit einer hTERT-spezifischen Sonde hybridisiert. Unterschied hinsichtlich der Fragmentanzahl oder Fragmentgrößen zwischen der Probe und einer Kontrolle zeigen eine Veränderung der experimentellen Probe an, normalerweise eine Insertion oder Deletion. Einzelstrang-Konformationspolymorphismus, SSCP, (Orrita, M. et. al., *PNAS USA* 86 (1989), 2766–70) ist eine weitere Technik, die für das vorliegende Verfahren angewandt werden kann. SSCP basiert auf der unterschiedlichen Wanderung von denaturierten einzelsträngigen DNAs des Wildtyps bzw. einer Mutante (die normalerweise durch PCR erzeugt wurden). Einzelsträngige DNA nimmt eine dreidimensionale Konformation ein, die sequenzspezifisch ist. Auch Sequenzunterschiede, die lediglich eine einzelne Base betreffen, können zu einer Mobilitätsverschiebung in einem nicht-denaturierenden Gel führen. SSCP ist aufgrund seiner Einfachheit eines der am häufigsten verwendeten Verfahren zum Mutations-Screenen. Eine weitere Technik, die bei dem vorliegenden Verfahren angewandt werden kann, ist die denaturierende Gradientengelelektrophorese, DGGE (Myers et al., *Methods in Enzymology* 155 (1987), 501–527). Mittels DGGE können Mutationen aufgrund des Schmelzverhaltens doppelsträngiger DNA identifiziert werden. Zur Analyse des Schmelzprofils von experimenteller DNA und Kontroll-DNA wird eine spezielle Ausrüstung für denaturierende Elektrophorese verwendet: Eine eine Mutation enthaltende DNA besitzt eine unterschiedliche Mobilität in diesen Gelsystemen im Vergleich zur Kontrolle. Die diskutierten Beispiele veranschaulichen allgemein angewandte Verfahren, darüber hinaus gibt es zahlreiche andere Verfahren, die dem Fachmann bekannt sind.

#### F. Analyse des Karyotyps

Die vorliegende Erfindung stellt ferner Verfahren und Reagenzien zur Analyse des Karyotyps oder für andere Chromosomen-Analysen bereit, wobei hTERT-Sequenzsonden verwendet werden und/oder der Nachweis oder die Lokalisierung von hTERT-Gensequenzen in Chromosomen eines Patienten, einer menschlichen Zelllinie oder einer nichtmenschlichen Zelle. In einer Ausführungsform kann die Amplifikation (d.h. eine Veränderung in der Kopienanzahl), Deletion (d.h. partielle Deletion), Insertion, Substitution oder Veränderungen in der chromosomalen Lokalisierung (z.B. Translokation) eines hTERT-Gens mit dem Vorhandensein eines pathologischen Zustands oder einer Prädisposition für die Entwicklung eines pathologischen Zustands (z.B. Krebs) korreliert sein.

Es wurde in der vorliegenden Erfindung festgestellt, dass in normalen menschlichen Zellen das hTERT-Gen nahe dem Telomer von Chromosom 5p kartiert (siehe das nachstehende Beispiel 5). Der am nächsten benachbarte STS-Marker ist D5S678. Dessen Lage kann zur Identifizierung von Markern verwendet werden, die mit dem hTERT-Gen eng gekoppelt sind. Diese Marker können zur Identifizierung von YACs, STSs, Cosmiden, BACs, lambda-Phagen oder P1-Phagen oder anderen Clonen verwendet werden, die genomische hTERT-Sequenzen oder -Kontrollelemente enthalten. Die Marker oder die Lage des Gens können verwendet werden, um menschliche Gewebeproben hinsichtlich Veränderungen in der normalen Lage des hTERT Gens, dessen Organisation oder Sequenz, die mit dem Auftreten eines Krebstyps oder einer Krankheit assoziiert sind, zu untersuchen. Diese Information kann dann für die Diagnose oder Prognose hinsichtlich der beteiligten Krankheit oder des Krebses verwendet werden. Darüber hinaus kann die Art jeder Veränderung des hTERT-Gens eine Information über die Ursachen liefern, durch die Zellen unsterblich werden. Beispielsweise könnte ein Translokationsereignis anzeigen, dass die Aktivierung der hTERT-Expression in manchen Fällen durch Austausch des hTERT-Promotors gegen einen anderen Promotor geschieht, der die hTERT-Transkription auf ungünstige Weise steuert. Erfindungsgemässe Verfahren und Reagenzien dieses Typs können zur Entwicklung von Strategien verwendet werden, mit denen hTERT-Aktivierungsprozesse bekämpft werden können. Die Lage ist auch für die Bestimmung der Natur der hTERT-Genrepression in normalen somatischen Zellen von Nutzen, beispielsweise bei der Untersuchung, ob die Lage innerhalb eines Teils von nicht-exprimierendem Heterochromatin ist. Assays, die auf einer Nuclease-Überempfindlichkeit basieren, zur Unterscheidung zwischen Heterochromatin und Euchromatin sind beispielsweise beschrieben in Wu et al., *Cell* 16 (1979), 797; Groudine und Weintraub, *Cell* 30 (1982), 131 und Gross und Garrard, *Ann. Rev. Biochem.* 57 (1988), 159.

In einer Ausführungsform werden Veränderungen des hTERT-Gens durch Analyse des Karyotyps identifiziert, wobei zahlreiche auf dem Fachgebiet bekannte Verfahren verwendet werden können. Ein zweckmässiges Verfahren ist die in situ-Hybridisierung (ISH). Wenn in situ-Hybridisierungsverfahren für die Karyotyp-Analyse verwendet werden, wird normalerweise eine nachweisbare oder nachweisbar markierte Probe mit einer chromosomalen Probe in situ zur Lokalisierung einer hTERT-Gensequenz hybridisiert. Im allgemeinen umfasst ISH einen oder mehrere der folgenden Schritte: (1) Fixierung des Gewebes, der Zelle oder der anderen zu analysierenden biologischen Struktur; (2) Vorhybridisierungsbehandlung der biologischen Struktur zur Steigerung der Zugänglichkeit der Ziel-DNA (z.B. Denaturierung mit Hitze oder Alkali) und zur Verringerung einer unspezifischen Bindung (z.B. durch Blockierung des Hybridisierungsvermögens repetitiver Sequenzen (z.B. mittels menschlicher genomischer DNA)); (3) Hybridisierung von einer oder mehreren Nucleinsäuren (z.B. übliche Nucleinsäuren, PNAs oder an-

dere Nucleinsäure-Analoga) mit der Nucleinsäure in der biologischen Struktur oder dem Gewebe; (4) Waschschritte nach der Hybridisierung zur Entfernung von Nucleinsäurefragmenten, die während der Hybridisierung nicht gebunden waren und (5) Nachweis der hybridisierten Nucleinsäurefragmente. Die in jedem dieser Schritte verwendeten Reagenzien und anzuwendenden Bedingungen hängen von der jeweiligen Anwendung ab. Natürlich können diese Schritte auf vielfältige Weise modifiziert werden, wie dies dem Fachmann bekannt ist.

In einer Ausführungsform der ISH wird die hTRT-Sonde mit einem Fluoreszenzmarker markiert (in situ Fluoreszenzhybridisierung; «FISH»). Normalerweise ist es wünschenswert, eine «zwei-Farben»-Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung anzuwenden, bei denen zwei mit einem unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoff markierte Sonden verwendet werden. Eine Testsonde, die mit der gewünschten hTRT-Sequenz hybridisiert, wird mit einem Farbstoff markiert, und eine Kontrollsonde, die mit einem anderen Bereich hybridisiert wird, wird mit einem zweiten Farbstoff markiert. Als Kontrollsonde kann eine Nucleinsäure verwendet werden, die mit einem stabilen Bereich des gewünschten Chromosoms, beispielsweise dem Zentromerbereich, hybridisiert. Auf diese Weise kann Unterschieden in der Effizienz der Hybridisierung, die von Probe zu Probe schwanken kann, Rechnung getragen werden.

Die ISH-Verfahren zum Nachweis chromosomaler Anomalien (z.B. FISH) können an Nanogrammen der fraglichen Nucleinsäuren durchgeführt werden. Es können in Paraffin eingebettete normale Gewebe oder Tumorsektionen verwendet werden, aber auch frisches oder gefrorenes Material, Gewebe oder Sektionen. Da FISH bei diesem begrenzten Material angewandt werden kann, können auch Präparationen von nichtkultivierten primären Tumoren, die nur in Spuren hergestellt werden können («touch»-Präparationen) verwendet werden (siehe z.B. Kallioniemi et al., Cytogenet. Cell Genet. 60 (1992) 190). Beispielsweise können kleine Biopsie-Gewebeproben von Tumoren für «touch»-Präparationen verwendet werden (siehe z.B. Kallioniemi et al., a.a.O.). Es können auch kleine Anzahlen von Zellen analysiert werden, die durch Saugbiopsie erhalten wurden oder Zellen in Körperflüssigkeiten (z.B. Blut, Urin, Sputum etc.) analysiert werden. Für eine pränatale Diagnose zählen Amnionflüssigkeit, Blut der Mütter etc. zu den geeigneten Proben. Zweckmässige für die hier beschriebenen Verfahren und Reagenzien anwendbare Hybridisierungsprotokolle sind beschrieben in Pinkel et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85 (1988), 9138; EP-A1 0 430 402; Choo (Herausg. Methods in Molecular Biology Vol. 33: In Situ Hybridization Protocols, Humana Press-Totowa, New Jersey (1994) und Kallioniemi et al., a.a.O.).

Zu weiteren für die Karyotyp-Analyse nützlichen Verfahren zählen beispielsweise Verfahren wie quantitatives Southern-Blotting, quantitative PCR oder vergleichende genomische Hybridisierung (Kallioniemi et al., Science 258 (1992), 818), wobei die erfindungsgemässen hTRT-Sonden und -Primer zur Identifikation einer Amplifikation, Deletion, Insertion, Substitution von hTRT-Sequenzen in Chromosomen in einer biologischen Probe oder andere Rearrangements von hTRT-Sequenzen verwendet werden können.

## G. TRT-Polypeptid-Assays

### 1) Allgemeines

Die vorliegende Erfindung stellt Verfahren und Reagenzien zum Nachweis und zur Quantifizierung von hTRT-Polypeptiden bereit. Zu diesen Verfahren zählen analytische biochemische Verfahren, beispielsweise Elektrophorese, Massenspektroskopie, «Gelshift», Kapillarelektrophorese, chromatographische Verfahren, beispielsweise Grössenausschluss, Hochdruckflüssigkeitschromatographie (HPLC), (TLC), Hyperdiffusionschromatographie etc., oder verschiedene immunologische Verfahren, beispielsweise Flüssigkeits- oder Gel-Präzipitin-Reaktion, Immundiffusion (Einzel- oder Doppel-), Immunelektrophorese, Radioimmunassay (RIA), enzymverbundene Immunabsorptionsbestimmungen (ELISAs), Immunfluoreszenz-Assays, Western-Blotting, Massenspektrometrie und weitere Verfahren, die nachstehend beschrieben werden und für den Fachmann nach Lesen dieser Beschreibung offensichtlich sind.

### 2) Elektrophoretische Assays

In einer Ausführungsform werden die hTRT-Polypeptide durch elektrophoretische Proteinauftrennung nachgewiesen. Ein Aspekt betrifft ein zweidimensionales Elektrophoresesystem.

Mittel zum Nachweis von Proteinen unter Verwendung von Elektrophoreseverfahren sind dem Fachmann gut bekannt (siehe allgemein R. Scopes (1982) Protein Purification, Springer-Verlag, N.Y.; Deutscher, Methods in Enzymology Vol. 182 (1990): Guide to Protein Purification, Academic Press, Inc., N.Y.).

In einer ähnlichen Ausführungsform wird ein «mobility shift»-Assay verwendet (siehe z.B. Ausubel et al., a.a.O.). Beispielsweise assoziiert markierte hTR mit hTRT und wandert mit veränderter Mobilität bei der Elektrophorese in einem nicht-denaturierten Polyacrylamidgel etc. Somit führt beispielsweise dann, wenn eine markierte hTR-Sonde oder ein markierter Telomerase-Primer mit einer hTRT enthaltenden Probe vermischt wird oder mit hTRT coexprimiert wird, (z.B. in einem zellfreien Expressionssystem) das Vorhandensein von hTRT-Protein (oder eines hTRT codierenden Polynucleotids) in der Probe zu einer nachweisbaren Änderung der hTRT-Mobilität.



## 3) Immunassays

## A) Allgemeines

Die vorliegende Erfindung stellt auch Verfahren zum Nachweis von hTERT-Polypeptiden bereit, wobei eine oder mehrere erfindungsgemässe Antikörperreagenzien verwendet werden (d.h. Immunassays). Wie hier verwendet, bezeichnet ein Immunassay einen Assay, bei dem ein Antikörper (wie hier ausführlich definiert gehören dazu auch Fragmente, chimäre und andere bindende Agenzien) verwendet wird, der spezifisch an ein hTERT-Polypeptid oder -Epitop bindet. Erfindungsgemässe Antikörper können durch eine Vielzahl von dem Fachmann bekannten Verfahren, beispielsweise den vorstehend beschriebenen, hergestellt werden.

Es ist eine Anzahl von gut etablierten immunologischen Bindungs-Assayformaten bekannt, die für die Durchführung der Erfindung geeignet sind (siehe z.B. US-Patente 4 366 241, 4 376 110, 4 517 288 und 4 837 168 und Methods in Cell Biology Volume 37: Antibodies in Cell Biology, Asai, Herausg. Academic Press, Inc. New York (1993); Basic and Clinical Immunology, 7. Ausgabe, Stites & Terr Herausg. (1991) Harlow und Lane, a.a.O.) z.B. Kapitel 14) und Ausubel et al., a.a.O. (z.B. Kapitel 11), wobei jedes dieser Dokumente durch Bezugnahme in seiner Gesamtheit und für alle Zwecke als Bestandteil dieser Beschreibung angesehen werden kann. Typischerweise wird in immunologischen Bindungsassays (oder Immunassays) ein «Einfang»-Agens zur spezifischen Bindung an den Analyten und oft auch dessen Immobilisierung verwendet. In einer Ausführungsform ist das «Einfang»-Agens eine Einheit, die an ein hTERT-Polypeptid oder eine Untersequenz spezifisch bindet, beispielsweise ein anti-hTERT-Antikörper. In einer alternativen Ausführungsform kann das «Einfang»-Agens unter solchen Bedingungen an hTERT assoziiertes Protein oder -RNA binden, bei denen das hTERT-assoziierte Molekül an die hTERT gebunden bleibt (so dass, falls das hTERT-assoziierte Molekül immobilisiert ist, das hTERT-Protein ähnlich immobilisiert ist). In Assays, bei denen ein hTERT-assoziiertes Molekül eingefangen wird, wird normalerweise das assoziierte hTERT-Protein, beispielsweise mittels eines anti-hTERT-Antikörpers oder ähnlichem nachgewiesen werden. Immunassays zum Nachweis von Proteinkomplexen sind auf dem Fachgebiet bekannt (siehe z.B. Harlow und Lane, a.a.O., S. 583).

Normalerweise wird das zu untersuchende hTERT-Genprodukt direkt oder indirekt mittels einer nachweisbaren Markierung nachgewiesen. Die in dem Assay verwendete spezielle Markierung bzw. die nachweisbare Gruppe ist normalerweise kein kritischer Aspekt der Erfindung solange diese nicht die spezifische Bindung des in dem Assay verwendeten Antikörpers oder den Antikörper wesentlich stört. Die Markierung kann mit dem «Einfang»-Agens kovalent verknüpft sein (z.B. ein anti-hTERT-Antikörper) oder er kann an eine dritte Einheit angeknüpft sein, beispielsweise einem anderen Antikörper, der beispielsweise an das hTERT-Polypeptid spezifisch bindet (an ein anderes Epitop als das, das von dem «Einfang»-Agens erkannt wird, das «Einfang»-Agens (z.B. ein anti-(erster Antikörper) Immunglobulin); ein anti-hTERT-Antikörper; ein Antikörper, der an einen anti-hTERT-Antikörper bindet oder ein Antikörper/Telomerase-Komplex (z.B. über die Bindung an ein assoziiertes Molekül, beispielsweise ein Telomerase-assoziiertes Protein). Andere Proteine, die an dem in dem Assay verwendeten Antikörper binden können, z.B. Protein A oder Protein G, können auch markiert sein. In einigen Ausführungsformen kann es zweckmässig sein, mehr als ein markiertes Molekül zu verwenden (d.h. solche, die voneinander unterschieden werden können). Zusätzlich kann ein markierter Antikörper, der das Protein oder die RNA, die mit dem hTERT-Protein assoziiert ist, erkennt, verwendet werden, wenn das durch das «Einfang»-Agens (z.B. ein anti-hTERT-Antikörper) gebundene (beispielsweise immobilisierte) Ziel ein Komplex ist (d.h. ein Komplex aus hTERT und einem hTERT-assoziierten Protein, hTERT oder einem anderen hTERT-assoziierten Molekül. Wenn es sich bei dem Komplex um einen Protein/Nucleinsäure-Komplex (z.B. hTERT-hTERT) handelt, kann das Reportermolekül ein Polynucleotid oder ein anderes Molekül (z.B. ein Enzym) sein, das die RNA-Komponente des Komplexes erkennt.

Bei einigen Immunassayformaten ist die Verwendung von markierten Bestandteilen nicht erforderlich. Beispielsweise können Agglutinationsassays zum Nachweis des Vorhandenseins der Ziel-Antikörper verwendet werden. In diesem Fall werden Antigen-geschichtete Partikel durch die Zielantikörper enthaltenen Proben agglutiniert. Bei diesem Assay-Format müssen die Bestandteile nicht markiert sein und die Anwesenheit des Ziel-Antikörpers kann durch einfache visuelle Überprüfung nachgewiesen werden.

## b) Nicht-kompetitive Assayformate

Die vorliegende Erfindung stellt Verfahren und Reagenzien für kompetitive und nicht-kompetitive Immunassays zum Nachweis von hTERT-Polypeptiden bereit. Bei nichtkompetitiven Immunassays handelt es sich um Assays, bei denen die Menge des eingefangenen Analyten (in diesem Fall hTERT) direkt gemessen wird. Ein Beispiel für einen solchen Assay ist ein auf monoclonalen Antikörpern basierender «twosite»-Immunassay, bei dem monoclonale Antikörper verwendet werden, die mit zwei nicht-interferierenden Epitopen auf dem hTERT-Protein reaktionsfähig sind. Siehe beispielsweise Maddox et al., i. Exp. Med. 158 (1983), 1211 bezüglich Hintergrundinformation. In einem bevorzugten «Sandwich»-Assay wird das «Einfang»-Agens (z.B. ein anti-hTERT-Antikörper) direkt an ein festes Substrat gebunden, wo es immobilisiert wird. Diese immobilisierten Antikörper fangen dann jedes in der Probe vorhandene hTERT-

Protein ein. Das so immobilisierte hTERT kann dann markiert werden, d.h. durch Bindung an einen zweiten, eine Markierung tragenden anti-hTERT-Antikörper. In einer alternativen Ausführungsform kann der zweite anti-hTERT-Antikörper zwar keine Markierung aufweisen, jedoch durch einen markierten dritten Antikörper gebunden werden, der spezifisch für Antikörper der Spezies ist, von der der zweite Antikörper stammt. In einer weiteren alternativen Ausführungsform kann der zweite Antikörper mit einer nachweisbaren Einheit modifiziert sein, beispielsweise Biotin, die ein drittes markiertes Molekül spezifisch binden kann, beispielsweise Enzym-markiertes Streptavidin.

#### c) Kompetitive Assayformate

In kompetitiven Assays wird die Menge des in einer Probe vorhandenen hTERT-Proteins indirekt durch Messung der Menge an zugegebenen (exogenen) hTERT bestimmt, das durch das in der Probe vorhandene hTERT-Protein von einem «Einfang»-Agens (z.B. einem anti-TERT-Antikörper) verdrängt, oder wegkompetitiert wurde. In einem dieser kompetitiven Assays wird eine bekannte Menge eines markierten hTERT-Proteins zu der Probe gegeben und danach die Probe mit einem «Einfang»-Agens (z.B. einem Antikörper, der hTERT-Protein spezifisch bindet) in Kontakt gebracht. Die Menge an exogenem (markiertem) an dem Antikörper gebundenem hTERT-Protein ist umgekehrt proportional zu der Konzentration an in der Probe vorhandenem hTERT-Protein. In einer Ausführungsform ist der Antikörper auf einem festen Substrat immobilisiert. Die Menge an hTERT-Protein, das an den Antikörper gebunden ist, kann entweder durch Messung der Menge an hTERT-Protein, die in einem TERT-Antikörper-Komplex vorhanden ist, bestimmt werden oder alternativ durch Bestimmung der Menge an übrigbleibendem nicht-komplexiertem TERT-Protein. Die Menge an hTERT-Protein kann durch die Bereitstellung eines markierten hTERT-Moleküls nachgewiesen werden.

Ein Hapten-Hemmungsassay stellt ein weiteres Beispiel für einen kompetitiven Assay dar. In diesem Assay ist hTERT-Protein auf einem festen Substrat immobilisiert. Eine bekannte Menge an anti-TERT-Antikörper wird zu der Probe gegeben und danach die Probe mit dem immobilisierten hTERT-Protein in Kontakt gebracht. In diesem Fall ist die Menge an anti-TERT-Antikörper, der an das immobilisierte hTERT-Protein gebunden ist, umgekehrt proportional zu der Menge an hTERT-Protein, das in der Probe vorhanden ist. Die Menge an immobilisiertem Antikörper kann entweder durch Nachweis der immobilisierten Antikörperfraktion bestimmt werden, oder der Antikörperfraktion, die in Lösung bleibt. Dabei kann der Nachweis direkt sein, im Falle, wenn der Antikörper markiert ist, oder indirekt, im Falle, dass die Markierung an ein Molekül gebunden ist, das an den vorstehend beschriebenen Antikörper spezifisch bindet.

#### d) Andere Assayformate

Die Erfindung stellt auch Reagenzien und Verfahren zum Nachweis und zur Quantifizierung des Vorhandenseins von hTERT in der Probe mittels eines Immunblots (Westernblot)-Formats bereit. In diesem Format werden hTERT-Polypeptide in einer Probe von anderen Bestandteilen der Probe durch Gelelektrophorese (z.B. auf der Basis des Molekulargewichts), die abgetrennten Proteine auf einen geeigneten festen Träger überführt (z.B. ein Nitrocellulosefilter, ein Nylonfilter, ein derivatisierter Nylonfilter etc.) und der Träger wird mit erfindungsgemässen anti-TERT-Antikörpern inkubiert. Die anti-TERT-Antikörper binden spezifisch an hTERT oder anderem TERT auf dem festen Träger. Diese Antikörper können entweder direkt markiert sein oder sie können alternativ anschliessend unter Verwendung markierter Antikörper (z.B. markierten Schaf-anti-Maus-Antikörpern) nachgewiesen werden oder mittels anderer markierter Reagenzien, die spezifisch an den anti-TERT-Antikörper binden.

Zu weiteren Assayformaten zählen Liposom-Immunassays (LIA), bei denen Liposome verwendet werden, die so konstruiert wurden, dass sie spezifische Moleküle (z.B. Antikörper) binden und eingekapselte Reagenzien oder Marker freisetzen. Die freigesetzten Chemikalien können im Anschluss daran gemäss Standardverfahren nachgewiesen werden (siehe Monroe et al., Amer. Clin. Prod. Rev. 4 (1986), 34).

Wie bereits vorstehend erwähnt, besitzen Assay-Formate, die FACS (und äquivalente Instrumente oder Verfahren) verwenden, Vorteile, wenn hTERT-Genprodukte in einer heterogenen Probe (z.B. einer sowohl normale als auch maligne Zellen enthaltenden Biopsieprobe) gemessen werden.

#### e) Substrate, feste Träger, Membrane und Filter

Wie bereits vorstehend angemerkt, können in Abhängigkeit von dem Assay verschiedene Bestandteile, einschliesslich dem Antigen, Zielantikörper oder anti-hTERT-Antikörper, an eine feste Oberfläche oder einen festen Träger (d.h. ein Substrat, eine Membran oder Filterpapier) gebunden sein. Viele Verfahren zur Immobilisierung von Biomolekülen an eine Vielzahl von festen Oberflächen sind auf dem Fachgebiet bekannt. Die feste Oberfläche kann beispielsweise eine Membran sein (z.B. Nitrocellulose), eine Mikrotiterplatte (z.B. PVC, Polypropylen oder Polystyrol), ein Teströhrchen (Glas oder Plastik), ein Teststreifen (z.B. Glas, PVC, Polypropylen, Polystyrol, Latex etc.), ein Gefäss für eine Mikrozentrifuge oder ein Glas- oder Plastikkügelchen. Der gewählte Bestandteil kann kovalent gebunden sein oder durch unspezifische Bindung nicht-kovalent angeknüpft sein.

Eine grosse Anzahl verschieden r organischer und anorganischer Polymere, die sowohl natürlich als auch synthetisch sein können, können als Material für die feste Oberfläche verwendet werden. Zu solchen Polymeren zählen Polyethylen, Polypropylen, Poly(4-methylbuten), Polystyrol, Polymethacrylat, Poly(ethylenterephthalat), Rayon, Nylon, Poly(vinylbutyrat), Polyvinylidendifluorid (PVDF), Silikone, Polyformaldehyd, Cellulose, Celluloseacetat, Nitrocellulose etc. Zu den weiteren Materialien, die verwendet werden können, zählen Papier, Gläser, Keramiken, Metalle, Metalloide, Materialien mit Halbleitereigenschaften, Zemente etc. Zusätzlich können gelbildende Substanzen verwendet werden, beispielsweise Proteine (z.B. Gelatine), Lipopolysaccharide, Silikate, Agarose und Polyacrylamide. Geeignet sind auch Polymere, die mehrere wässrige Phasen bilden, beispielsweise Dextrane, Polyalkylenglykole oder Tenside, beispielsweise Phospholipide, langkettige (12 bis 24 Kohlenstoffatome) Alkylammoniumsalze etc. Bei porösen festen Oberflächen können in Abhängigkeit von der Art des Systems verschiedene Porengrößen verwendet werden.

Zur Herstellung der Oberfläche kann eine Vielfalt von verschiedenen Substanzen zum Erhalt verschiedener Eigenschaften verwendet werden, insbesondere als Lamine. Beispielsweise können zur Vermeidung einer unspezifischen Bindung, zur Vereinfachung einer kovalenten Konjugation, zur Verstärkung des Signalnachweises etc. Proteinbeschichtungen wie Gelatine verwendet werden.

Wenn eine kovalente Bindung zwischen einer Verbindung und der Oberfläche erwünscht ist, ist die Oberfläche normalerweise polyfunktionell oder sie kann polyfunktionell gemacht werden. Zu den funktionellen Gruppen, die auf der Oberfläche vorhanden und für eine Verknüpfung verwendet werden können, gehören Carboxylsäuren, Aldehyde, Aminogruppen, Cyangruppen, Ethylengruppen, Hydroxylgruppen, Mercaptogruppen etc. Die Art und Weise, wie solche Verknüpfungen durchgeführt werden können, ist für eine grosse Anzahl von Verbindungen an verschiedene Oberflächen allgemein bekannt und in der Literatur ausführlich beschrieben. siehe beispielsweise Immobilized Enzymes, Ichiro Chibata, Halsted Press, New York, 1978 und Cuatrecasas, J. Biol. Chem. 245 (1970) 3059.

Zusätzlich zur kovalenten Bindung können verschiedene Verfahren zur nicht-kovalenten Bindung eines Assaybestandteils verwendet werden. Eine nicht-kovalente Bindung ist typischerweise die unspezifische Absorption einer Verbindung an die Oberfläche.

Natürlich ist die Herabsetzung einer unspezifischen Bindung in Immunassays wünschenswert. Insbesondere dann, wenn der Assay ein Antigen oder einen Antikörper beinhaltet, der auf einem festen Substrat immobilisiert ist, ist die Minimierung der Menge an unspezifischer Bindung an das Substrat wünschenswert. Mittel zur Herabsetzung einer solchen unspezifischen Bindung sind dem Fachmann gut bekannt. Dies beinhaltet typischerweise die Beschichtung des Substrats mit einer Proteinzusammensetzung. Insbesondere Proteinzusammensetzungen, die beispielsweise Rinderserumalbumin (BSA), fettfreies Milchpulver und Gelatine werden häufig verwendet, wobei gelegentlich Milchpulver bevorzugt wird. In einer alternativen Ausführungsform kann die Oberfläche so gestaltet sein, dass sie einen Bestandteil unspezifisch bindet, einen anderen jedoch nicht wesentlich bindet. Beispielsweise bindet eine ein Lectin, wie beispielsweise Concanavalin A, tragende Oberfläche eine Kohlenhydrat enthaltende Verbindung, jedoch nicht ein unglykosyliertes markiertes Protein. Die US-Patente Nr. 4 447 576 und 4 254 082 geben einen Überblick über verschiedene feste Oberflächen zur Verwendung bei der nicht-kovalenten Verknüpfung von Assay-Bestandteilen.

#### H. Assays für Anti-TRT-Antikörper

Die vorliegende Erfindung stellt auch Reagenzien und Assays zum Nachweis von hTRT-spezifischen Immunglobulinen bereit. In einer Ausführungsform wird immobilisierte hTRT (z.B. rekombinante hTRT, die an die Vertiefung einer Mikrotiterplatte gebunden ist) mit Serum von einem Patienten unter Bedingungen inkubiert, bei denen anti-hTRT-Antikörper, wenn sie vorhanden sind, die immobilisierte hTRT binden. Nach dem Waschen zur Entfernung von unspezifisch gebundenem Immunglobulin können gebundene Serumantikörper, falls sie vorhanden sind, durch Zugabe von nachweisbar markierten anti-(menschliches Ig)-Antikörpern nachgewiesen werden (alternative Ausführungsform oder Variationen sind dem Fachmann gut bekannt; siehe beispielsweise Harlow, a.a.O., Kapitel 14). Diese Assays sind für den Nachweis von anti-hTRT-Antikörpern in beliebigen Quellen einschliesslich tierischem oder menschlichem Serum oder einem Träger, wie beispielsweise Kochsalzlösung, von Nutzen. In einer Ausführungsform werden die Assays zum Nachweis oder zur Überwachung einer Immunantwort auf hTRT-Proteine in einem Patienten verwendet, insbesondere einer Autoimmunantwort (z.B. anti-Telomerase). Anti-hTRT-Antikörper können im Serum, an den Geweben oder Flüssigkeiten von einem Patienten vorhanden sein, der an einer Autoimmunkrankheit oder einem anderen Zustand leidet.

#### I) Assaykombinationen

Die hier beschriebenen diagnostischen und prognostischen Assays können in verschiedenen Kombinationen und auch in Verbindung mit anderen diagnostischen oder prognostischen Tests durchgeführt werden. Wenn beispielsweise die vorliegenden Verfahren zum Nachweis des Vorhandenseins von Krebszellen in einer Patientenprobe verwendet werden, kann die Anwesenheit von hTRT dazu benutzt werden, um das Krankheitsstadium zu bestimmen, ob es wahrscheinlich ist, dass ein bestimmter Tu-

mor in angrenzendes Gewebe eindringt oder zu einem entfernten Standort metastasiert und ob ein erneutes Auftreten des Krebses wahrscheinlich ist. Zu den Tests, die zusätzliche Informationen liefern können, gehören die mikroskopische Analyse von Biopsieproben, der Nachweis von Antigenen (z.B. Zelloberflächenmarkern), die mit einer möglichen Tumorentstehung assoziiert sind (z.B. mittels Histocytochemie, FACS etc.), bildgebende Verfahren (z.B. nach Verabreichung eines markierten anti-Tumor-Antikörpers an einen Patienten), Telomerase-Aktivitätsassays, Telomerase-Längenassays, hTR-Assays etc. Solche kombinierten Tests können bezüglich des Fortschreitens einer Krankheit nützliche Informationen liefern.

Die Kombination von Assays kann auch nützliche Informationen liefern. Beispielsweise können, wie bereits vorstehend angemerkt, Assays für hTERT-mRNA mit Assays für hTR (RNA) oder Telomerase-Aktivität (d.h. TRAP) kombiniert werden, um so Informationen über Telomerase-Assemblierung und -Funktion zu liefern.

#### J) Kits

Die vorliegende Erfindung stellt auch Kits bereit, die das Screenen, die Überwachung, Diagnose und Prognose bei Patienten mit einem mit Telomerase in Zusammenhang stehenden Zustand von Nutzen sind oder zur Bestimmung des Expressionsspiegels von hTERT in Zellen oder Zelllinien. Die Kits enthalten eines oder mehrere Reagenzien zur Bestimmung des Vorhandenseins oder des Fehlens eines hTERT-Genprodukts (RNA oder Protein) oder zur Quantifizierung der Expression des hTERT-Gens. Zu den bevorzugten Reagenzien gehören Nucleinsäureprimer und Sonden, die an das hTERT-Gen, -RNA, -cDNA oder Anteile davon binden, aber auch Proteine, Peptide, Antikörper und Kontroll-Primer, -Sonden, -Oligonucleotide, -Proteine, -Peptide und -Antikörper. Weitere Substanzen können aufgenommen werden, dazu gehören Enzyme (z.B. reverse Transkriptasen, DNA-Polymerasen, Ligasen), Puffer und Reagenzien (Markierungen, dNTPs).

Die Kits können alternativ oder in Kombination mit irgendwelchen anderen hier beschriebenen Bestandteilen einen Antikörper enthalten, der spezifisch an hTERT-Polypeptide oder Untersequenzen davon bindet. Es kann ein monoklonaler oder polyclonaler Antikörper sein. Der Antikörper kann an eine weitere Einheit konjugiert sein, beispielsweise eine Markierung und/oder er kann auf einem festen Träger (Substrat) immobilisiert sein. Der (die) Kit(s) kann (können) auch einen zweiten Antikörper zum Nachweis von hTERT-Polypeptid/Antikörper-Komplexen oder zum Nachweis von hybridisierten Nucleinsäuresonden enthalten, sowie ein oder mehrere hTERT-Peptide oder -Proteine zur Kontrolle oder andere Reagenzien.

Der Antikörper oder die Hybridisierungssonde kann frei vorliegen oder an einen festen Träger immobilisiert sein, beispielsweise ein Teströhrchen, eine Mikrotiterplatte, ein Teststäbchen etc. Der Kit kann auch Anleitungen enthalten, die die Verwendung des Antikörpers oder der Hybridisierungssonde in einem Assay zum Nachweis einer Prädisposition für TRT beschreiben. Der Kit kann geeignete Reagenzien zum Nachweis von Markierungen oder zur Markierung positiver und negativer Kontrollen, Waschlösungen, Verdünnungspuffer etc. enthalten.

In einer Ausführungsform enthält der Kit ein Primerpaar zur Amplifikation von hTERT-mRNA. Ein solcher Kit kann auch eine Sonde für amplifizierte hTERT-DNA und/oder eine Polymerase, Puffer, dNTPs etc. enthalten. In einer weiteren Ausführungsform umfasst der Kit eine Sonde, gegebenenfalls eine markierte Sonde. In einer anderen Ausführungsform umfasst der Kit einen Antikörper.

#### X. Identifizierung von Modulatoren von Telomerase-Aktivität

##### A. Allgemeines

Die Erfindung stellt Verbindungen und Behandlungen bereit, die die Aktivität oder Expression einer Telomerase oder eines Telomerase-Bestandteils (z.B. hTERT-Protein) modulieren. Die Erfindung stellt auch Assays und Screening Verfahren (einschliesslich Screening-Verfahren mit hohem Durchsatz) zur Identifizierung von Verbindungen und Behandlungen bereit, die Telomerase-Aktivität oder -Expression modulieren. Zu diesen Modulatoren von Telomerase-Aktivität und -Expression (die nachstehend als «Modulatoren» bezeichnet werden) gehören Telomerase-Agonisten (die Telomerase-Aktivität und/oder -Expression steigern) und Telomerase-Antagonisten (die Telomerase-Aktivität und/oder -Expression herabsetzen).

Die erfindungsgemässen Modulatoren haben eine grosse Anzahl von Anwendungsmöglichkeiten. Beispielsweise wird davon ausgegangen, dass Telomerase-Modulatoren wirksame therapeutische Mittel zur Behandlung von menschlichen Krankheiten sind. Das Screenen nach agonistischer Aktivität und Aktivatoren der Transkription oder Translation erlaubt die Bereitstellung von Zusammensetzungen, die eine Telomerase-Aktivität in einer Zelle (einschliesslich einer Telomerase-abhängigen Replikationsfähigkeit oder einer «partiellen» Telomerase-Aktivität) steigern können. Solche agonistischen Zusammensetzungen erlauben auch die Bereitstellung von Verfahren zur Immortalisierung von ansonsten normalen untransformierten Zellen, wozu Zellen gehören, die nützliche Proteine exprimieren können. Solche Agonisten erlauben auch die Bereitstellung von Verfahren zur Regulierung zellulärer Seneszenz. Umgekehrt erlaubt

das Screenen nach antagonistischer Aktivität die Bereitstellung von Zusammensetzungen, die eine Telomer-abhängige Replikationsfähigkeit herabsetzen und dadurch Zellen mortalisieren, die ansonsten unsterblich sind, beispielsweise Krebszellen. Das Screenen nach antagonistischer Aktivität erlaubt die Bereitstellung von Zusammensetzungen, die Telomerase-Aktivität herabsetzen und dadurch eine unbegrenzte Zellteilung von Zellen, die ein unreguliertes Zellwachstum zeigen, beispielsweise Krebszellen, verhindern. Beispiele von Erkrankungen und Zuständen, die mittels der Modulatoren behandelt werden können, sind hier aufgezählt, beispielsweise in den vorstehenden Abschnitten VII und IX. Im allgemeinen können die erfindungsgemässen Modulatoren immer dann verwendet werden, wenn eine Steigerung oder eine Herabsetzung einer Telomerase-Aktivität in einer Zelle oder einem Organismus erwünscht ist. Somit kann ein Modulator, der hTERT-Expressionsspiegel steigert, zusätzlich zur Verwendung bei der Krankheitsbehandlung zur Herstellung einer kultivierten menschlichen Zelllinie verwendet werden, die Eigenschaften aufweist, wie sie allgemein in dem vorstehenden Abschnitt VIII beschrieben sind und er weist zahlreiche andere Anwendungsmöglichkeiten auf, die für den Fachmann offensichtlich sind.

Eine Verbindung oder Behandlung moduliert die «Expression» von Telomerase oder eines Telomerase-Bestandteils, wenn die Verabreichung der Verbindung oder der Behandlung die Transkriptionsrate oder den Transkriptionsspiegel des einen Telomerase-Bestandteil codierenden Gens (z.B. hTERT-mRNA codierenden Gens) verändert, beeinflusst die Stabilität oder die posttranskriptionale Prozessierung von einem Telomerase-Bestandteil codierende RNA (z.B. Transport, Spleissen, Polyadenylierung oder eine andere Modifizierung), beeinflusst Translation, Stabilität, posttranslationale Prozessierung oder die Modifizierung eines codierten Proteins (z.B. hTERT) oder verändert auf andere Art und Weise den Spiegel an funktionellem (z.B. katalytisch aktivem) Telomerase-RNP. Eine Verbindung oder Behandlung beeinflusst dann eine Telomerase-«Aktivität», wenn die Verabreichung der Verbindung oder Behandlung eine Telomerase verändert, beispielsweise jene, die in dem vorstehenden Abschnitt IV (B) beschrieben sind (z.B. gehören dazu eine prozessive oder nicht-prozessive katalytische Aktivität von Telomerase; Telomerase-Prozessivität, konventionelle reverse Transkriptase-Aktivität; nucleolytische Aktivität; Primer- oder Substrat-bindende Aktivität; dNTP-bindende Aktivität; RNA-bindende Aktivität; Beeinflussung der Telomerase-RNP-Assemblierung und Protein-bindende Aktivität). Es gibt nicht unbedingt eine scharfe Abgrenzung zwischen Änderung in der «Aktivität» und Veränderungen in der «Expression». Diese Ausdrücke werden zur Erleichterung der Diskussion, jedoch nicht zur Einschränkung verwendet. Die erfindungsgemässen Modulatoren sollten Telomerase-Aktivität oder -Expression beeinflussen (z.B. ohne allgemein die Expression von «housekeeping»-Proteinen, wie Actin, ändern) und nicht beispielsweise die Expression eines Telomerase-Bestandteils durch unspezifische Vergiftung einer Zielzelle herabsetzen.

#### B. Assays zur Identifizierung von Telomerase-Modulatoren

Die Erfindung stellt Verfahren und Reagenzien zum Screenen nach Zusammensetzungen oder Verbindungen bereit, die die Expression einer Telomerase oder eines Telomerase-Bestandteils beeinflussen können, die Replikationsfähigkeit von Telomerase bezüglich DNA modifizieren können oder anderweitig die Fähigkeit des Telomerase-Enzyms und des TRT-Proteins Telomer-DNA synthetisieren zu können («volle Aktivität») modifizieren. Die Erfindung stellt auch Screening-Verfahren für Modulatoren einer beliebigen «partiellen Aktivität» von hTERT oder allen dieser Aktivitäten bereit. Somit stellt die vorliegende Erfindung Assays bereit, die zum Screenen nach Agensen verwendet werden können, die die Aktivität von Telomerase steigern, beispielsweise dadurch, dass sie dazu führen, dass hTERT-Protein oder Telomerase in einer Zelle exprimiert wird, in der diese normalerweise nicht exprimiert wird, oder durch Steigerung der Spiegel an Telomerase-Aktivität in Telomerase-positiven Zellen.

Telomerase oder Proteine einer Telomerase-Untereinheit, deren katalytische oder immunogene Fragmente oder Oligopeptide davon können zum Screenen nach therapeutischen Verbindungen in einer Vielzahl von Verfahren zum Screenen von Wirkstoffen verwendet werden. Das in einem solchen Test verwendete Fragment kann frei in Lösung vorliegen, an einen festen Träger fixiert sein, von einer Zelloberfläche getragen, oder intrazellulär lokalisiert sein. Die Bildung von Bindungskomplexen zwischen Telomerase oder dem Untereinheitenprotein und dem zu testenden Agens kann gemessen werden.

In verschiedenen Ausführungsformen zählen zu der Erfindung Verfahren zum Screenen nach Antagonisten, die an das aktive Zentrum des Enzyms binden; die Assoziation seiner RNA-Einheit, von Telomerase-assoziierten Proteinen, Nucleotiden oder Telomer-DNA an Telomerase oder hTERT-Protein hemmen; die Dissoziation des Enzymkomplexes fördern; die Transkription der Telomerase-RNA-Einheit (z.B. hTR) stören oder eine der hier beschriebenen «partiellen Aktivitäten» hemmen. Die Erfindung betrifft auch das Screenen nach Zusammensetzungen, die die Assoziation von Nucleinsäure und/oder Telomerase-assoziierten Zusammensetzungen mit hTERT, z.B. die Assoziation von hTR mit hTERT oder die Assoziation von hTERT mit dem menschlichen Homolog von p80 oder einem anderen assoziierten Protein oder die Assoziation von hTERT mit einem Telomer oder einem Nucleotid hemmen; das Screenen nach Zusammensetzung, die die Dissoziation oder Assoziation (d.h. Assemblierung) des Enzymkomplexes fördern, beispielsweise ein Antikörper, der gegen hTR oder hTERT gerichtet ist; das Screenen nach Agensen, die die Prozessivität des Enzyms beeinflussen und das Screenen nach Nucleinsäuren und anderen Zusammensetzungen, die Telomerase binden, wie beispielsweise eine zu hTR komple-

mentäre Nucleinsäure. Die Erfindung zieht darüber hinaus auch das Screenen nach Zusammensetzungen in Betracht, die die Transkription des hTERT-Gens und/oder die Translation des hTERT-Genprodukts erhöhen oder herabsetzen. Die Erfindung zieht auch ein Screening-Verfahren in Betracht, Telomerase-Modulatoren in Tieren, in einer Ausführungsform durch die Rekonstitution einer Telomerase-Aktivität oder einer anti-Telomerase-Aktivität in ein Tier, beispielsweise in einem transgenen Tier. Die Erfindung stellt auch in vivo Assaysysteme bereit, zu denen «knockout»-Modelle gehören, bei denen eine oder verschiedene Einheiten der endogenen Telomerase, der Telomerase-RNA-Einheit und/oder Telomerase-assoziierte Proteine deletiert oder gehemmt wurden. Dabei kann die endogene Telomerase-Aktivität vollständig oder partiell erhalten geblieben sein. In einer Ausführungsform wird eine exogene Telomerase-Aktivität voll oder partiell rekonstituiert.

In einer erfindungsgemässen Ausführungsform wird eine Reihe von Assays hinsichtlich einer partiellen Telomerase Aktivität bereitgestellt, die die Identifizierung einer Vielfalt verschiedener Klassen von Modulatoren von Telomerase-Aktivität erlauben. Die erfindungsgemässen «Teilaktivitäts»-Assays erlauben die Identifizierung von Modulatorklassen von Telomerase-Aktivität, die ansonsten in einem «Vollaktivitäts»-Telomerase-Assay nicht hätten nachgewiesen werden können. Bei einem Teilaktivitäts-Assay ist die nicht-prozessive Aktivität von TRT und Telomerase beteiligt. Die prozessive Natur der Telomerase wird von Morin, Cell 59 (1989), 521–529 beschrieben; siehe auch Prowse «Identification of a nonprocessive telomerase-activity from mouse cells» Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90 (1993), 1493–1497. Bei einem weiteren erfindungsgemässen Teilaktivitäts-Assay wird die «Reverse Transkriptase-ähnliche»-Aktivität von Telomerase genutzt. Bei diesen Assays wird die reverse Transkriptase-Aktivität des hTERT-Proteins untersucht; siehe Lingner «Reverse transcriptase motifs in the catalytic subunit of telomerase», Science 276 (1997), 561–567. Bei einem weiteren erfindungsgemässen Teilaktivitäts-Assay wird die «nucleolytische Aktivität» von hTERT und Telomerase, zu der die Entfernung von mindestens einem Nucleotid vom 3'-Strang, typischerweise Guanosin, durch das Enzym beinhaltet, genutzt. Diese nucleolytische Aktivität wurde in Tetrahymena-Telomerase von Collins «Tetrahymena telomerase catalyzes nucleolytic cleavage and nonprocessive elongation» Genes Dev. 7 (1993), 1364–1376 beobachtet. Bei einem weiteren erfindungsgemässen Teilaktivitäts-Assay ist eine Analyse der Fähigkeit von hTERT und Telomerase als Teil deren Aktivität hinsichtlich der prozessiven DNA-Polymerisation bezeichnet. Ein weiterer erfindungsgemässer Teilaktivitäts-Assay beinhaltet die Analyse der Fähigkeit von hTERT oder Telomerase, deren RNA-Einheit zu binden, d.h. hTR menschliche Zellen, die als eine Matrice für die Telomer-Synthese verwendet wird. Weitere erfindungsgemässe Teilaktivitäts-Assays beinhalten die Analyse der Fähigkeit von hTERT und Telomerase-Chromosomen in vivo zu binden oder oligonucleotid-Primer in vitro oder in rekonstituierten Systemen zu binden oder Proteine zu binden, die mit chromosomalen Strukturen assoziiert sind (siehe bezüglich eines Beispiels für ein solches Protein Harrington, J. Biol. Chem. 270 (1995), 8893–8901). Zu den chromosomalen Strukturen, die hTERT binden, gehören beispielsweise DNA der Telomer-Wiederholungseinheit, Telomer-Proteine, Histone, nucleäres Matrixprotein, Kontrollproteine für die Zellteilung oder den Zellcyclus etc.

In einer Ausführungsform umfasst ein Assay zur Identifizierung von Modulatoren das Inkontaktbringen von einer oder mehreren Zellen (d.h. «Testzellen») mit einer Testverbindung und die Bestimmung, ob die Testverbindung die Expression oder Aktivität einer Telomerase (oder eines Telomerase-Bestandteils) in der Zelle beeinflusst. Üblicherweise umfasst diese Bestimmung den Vergleich der Aktivität oder der Expression in der Testzelle mit einer ähnlichen Zelle oder Zellen (d.h. Kontrollzellen), die mit der Testverbindung nicht in Kontakt gebracht wurden. In einer alternativen Ausführungsform können anstelle von intakten Zellen Zellextrakte verwendet werden. In einer verwandten Ausführungsform wird die Testverbindung an einen multizellulären Organismus (z.B. eine Pflanze oder ein Tier) verabreicht. Die Telomerase oder der Telomerase-Bestandteil kann für die Zelle oder den multizellulären Organismus vollständig endogen sein (d.h. von natürlich vorkommenden endogenen Genen codiert), es kann sich auch um eine rekombinante Zelle oder einen transgenen Organismus handeln, der einen oder mehrere rekombinant exprimierte Telomerase-Bestandteile umfasst (z.B. hTERT, hTR, Telomerase-assoziierte Proteine) oder die Zelle bzw. der multizelluläre Organismus kann sowohl endogene als auch rekombinante Bestandteile aufweisen. Somit werden in einer Ausführungsform Telomerase-Aktivitäts-Modulatoren an sterbliche Zellen verabreicht. In einer weiteren Ausführungsform werden Telomerase-Aktivitäts-Modulatoren an unsterbliche Zellen verabreicht. Beispielsweise können Antagonisten der Telomerase-vermittelten DNA-Replikation dadurch identifiziert werden, dass die vermutlich hemmende Zusammensetzung an eine Zelle verabreicht wird, von der bekannt ist, dass sie signifikante Mengen an Telomerase-Aktivität aufweist, beispielsweise Krebszellen.

In einer weiteren Ausführungsform wird ein Modulator durch Überwachung einer Veränderung in einer Telomerase-Aktivität eines Ribonucleoprotein-Komplexes (RNP) identifiziert, der eine TRT (z.B. hTERT) und eine Matrizen-RNA (z.B. hTR) umfasst, wobei der RNP in vitro rekonstituiert wird (wie beispielsweise in dem nachstehenden Beispiel 7 beschrieben).

In einer weiteren Ausführungsform wird der Modulator durch Überwachung einer Veränderung in der Expression eines TRT-Genprodukts (z.B. RNA oder Protein) in einer Zelle, einem Tier, einem in vitro-Expressionssystem oder anderem Expressionssystem identifiziert.

In einer weiteren Ausführungsform wird der Modulator anhand der Veränderung der Expression eines Reportergens identifiziert, beispielsweise eines solchen, wie es in Beispiel 15 beschrieben wird, wobei

dessen Expression ganz oder teilweise durch ein natürlich vorkommendes TRT-regulatorisches Element, beispielsweise inen Promotor oder Enhancer, reguliert wird. In einer verwandten Ausführungsform wird die Fähigkeit einer Testverbindung, einen Telomerasebestandteil (z.B. hTRT) zu binden, RNA oder eine Gen-regulatorische Sequenz (z.B. den TRT-Genpromotor) untersucht.

5 In einer weiteren Ausführungsform wird der Modulator durch die Beobachtung von Veränderungen in der hTRT-prä-mRNA-Produktion identifiziert, wobei sich dies beispielsweise auf alternativ gespleissste Produkte, alternative Polyadenylierungsereignisse, RNA-Spaltung etc. bezieht. In einer verwandten Ausführungsform kann die Aktivität des Modulators durch Überwachung der Herstellung von hTRT-Polypeptiden untersucht werden, von denen einige eine Aktivität für eine dominant-negative Telomerase-Regulation besitzen können.

10 Assay-Formate für die Identifizierung von Verbindungen, die die Expression und Aktivität von Proteinen beeinflussen, sind in der biotechnologischen und pharmazeutischen Industrie gut bekannt und für den Fachmann sind zusätzliche Assays und Variationen der vorstehend zur Veranschaulichung bereitgestellten Assays offensichtlich.

15 Veränderungen in Telomerase-Aktivität oder -Expression können durch jedes geeignete Verfahren gemessen werden. Für Änderungen im Expressionsspiegel eines Telomerase-Bestandteils (z.B. des hTRT-Proteins) oder eines Vorläufers (z.B. hTRT-mRNA) können unter Verwendung von dem Fachmann gut bekannten Verfahren untersucht werden. Einige dieser Verfahren sind hier beschrieben, beispielsweise in Abschnitt IX und dazu zählt die Überwachung der Spiegel von TRT-Genprodukten (z.B. Protein und RNAs) durch Hybridisierung (z.B. unter Verwendung der erfindungsgemässen TRT-Sonden und -Primer), Immunassays (z.B. mittels der erfindungsgemässen anti-TRT-Antikörper), RNase-Schutzassays, Amplifikationsassays oder jedes andere für einen Nachweis geeignete Mittel, das hier beschrieben oder auf dem Fachgebiet bekannt ist. Die Quantifizierung der Mengen an Nucleinsäure in einer Probe (z.B. die Bestimmung von RNA-Spiegeln, beispielsweise hTR- oder hTRT-mRNA) ist ebenfalls für die Bestimmung von transkriptionellen Regulatoren in cis oder trans von Nutzen.

25 Auf ähnliche Weise können Veränderungen in einer Telomerase-Aktivität unter Verwendung der hier (z.B. in Abschnitt IV (B), s.o.) beschriebenen Verfahren oder anderer Assays bezüglich einer Telomerase-Funktion gemessen werden. Die Quantifizierung von Telomerase-Aktivität kann, falls erwünscht, durch jedes Verfahren, einschliesslich der hier beschriebenen, durchgeführt werden. Telomerase-Antagonisten, die den Verlust einer Telomer-Struktur bewirken oder beschleunigen, können durch Überwachung oder Messung ihres Effekts auf Telomerase-Aktivität in vivo, ex vivo oder in vitro identifiziert werden, aufgrund ihrer Auswirkungen auf die Telomer-Länge (durch Anfärbung oder die Verwendung von «tagged»-Hybridisierungssonden) oder einfach durch die Untersuchung der Zellteilung von Telomerase-positiven Krebszellen (kritisches Verkürzen von Telomeren führt zu einem «Krise» bezeichneten Phänomen oder zur M2-Seneszenz (Shay, Biochem. Biophys. Acta 1072 (1991) 1-7), wobei dies durch die Aktivierung von Telomerase bei den Krebszellen umgangen wird, jedoch bei dem Fehlen von Telomerase zu deren Seneszenz führt oder zu deren Tod aufgrund einer chromosomalen Deletion und eines chromosomalen Rearrangements). Die Rekonstitution von menschlicher Telomerase-Aktivität in vivo liefert ein Verfahren zum Screenen nach Telomerase-Modulatoren in Zellen oder Tieren jeden Ursprungs.

40 Solche Agonisten können in einem erfindungsgemässen Aktivitätsassay identifiziert werden, was die Bestimmung von messbaren Veränderungen in der Telomer-Länge, wie vorstehend beschrieben, einschliesst. Weitere Beispiele von Assays zur Messung von Telomerase-Aktivität in Zellen beinhalten die Akkumulation oder den Verlust von Telomer-Strukturen, den TRAP-Assay oder einen Assay bezüglich einer quantitativen Polymerase-Kettenreaktion.

45 In einer Ausführungsform umfassen die erfindungsgemässen Assays auch ein Verfahren, bei dem die Testverbindung für eine statistisch signifikante Herabsetzung in der Aktivität von hTRT im Vergleich zu den relativen Mengen einer eingebauten Markierung in einer Parallelreaktion sorgt, bei der das Agens fehlt, wodurch nachgewiesen werden kann, dass das Agens ein Telomerase-Inhibitor ist.

50 Die erfindungsgemässen Verfahren können anhand von Protokollen adaptiert werden, die in der wissenschaftlichen Literatur und der Patentliteratur beschrieben sind, und auf dem Fachgebiet bekannt sind. Beispielsweise können dann, wenn eine erfindungsgemässe Telomerase oder ein TRT-Protein zur Identifizierung von Zusammensetzungen verwendet wird, die als Modulatoren von Telomerase-Aktivitäten wirken, eine grosse Anzahl von möglicherweise nützlichen Molekülen in einem einzigen Test gescreent werden. Die Modulatoren können auf eine Telomerase-Aktivität eine hemmende (Antagonisten)- oder potenzierende (Agonisten)-Wirkung aufweisen. Beispielsweise können dann, wenn ein Feld von 1000 Inhibitoren gescreent werden soll, im Prinzip alle 1000 Inhibitoren in eine Mikrotiterplattenvertiefung gegeben und gleichzeitig getestet werden. Wenn ein solcher Inhibitor entdeckt wird, kann dann der Pool von 1000 in 10 Pools von 100 aufgeteilt werden und der Prozess solange wiederholt werden, bis ein individueller Inhibitor identifiziert ist.

60 Beim Screenen von Wirkstoffen wird eine hohe Anzahl von Verbindungen hinsichtlich ihrer Fähigkeit als Telomerase-Modulatoren zu wirken, untersucht, wobei dieser Prozess durch Verfahren des Screening mit hohem Durchsatz («high throughput screening») stark beschleunigt wird. Die hier beschriebenen Assays für eine vollständige oder partielle Telomerase-Aktivität können zur Verwendung in einem Verfahren mit hohem Durchsatz adaptiert werden. Es ist für den Fachmann offensichtlich, dass für diesen Zweck zahlreiche Verfahren zur Verfügung stehen.

65



Ein weiteres Verfahren zum Screenen von Wirkstoffen, das für das Screenen von Verbindungen mit geeigneten Bindungsaffinitäten für die Telomerase oder ein Protein einer Telomerase-Untereinheit mit hohem Durchsatz verwendet werden kann, ist ausführlich in «Determination of Amino Acid Sequence Antigenicity» von Geysen beschrieben (Geysen, PCT-Veröffentlichung WO 84/034 564, veröffentlicht am 13. September 1984, wobei dieses Dokument durch Bezugnahme als Bestandteil dieser Beschreibung angesehen werden kann). Zusammenfassend kann gesagt werden, dass eine grosse Anzahl von unterschiedlichen kleinen Peptid-Testverbindungen auf einem festen Substrat, beispielsweise Plastikstiften oder einer anderen Oberfläche, synthetisiert wird. Die Peptid-Testverbindungen werden mit Fragmenten von Telomerase oder Proteinuntereinheiten von Telomerase zur Reaktion gebracht und gewaschen. Gebundene Telomerase oder eine Telomerase-Proteinuntereinheit wird dann durch allgemein bekannte Verfahren nachgewiesen. Im wesentlichen gereinigte Telomerase bzw. eine Telomerase-Protein-Untereinheit kann auch direkt auf Platten zur Verwendung bei den vorstehend erwähnten Verfahren zum Screenen von Wirkstoffen als Beschichtung aufgebracht werden. In einer alternativen Ausführungsform können nicht-neutralisierende Antikörper zum Einfangen des Peptids und zu dessen Immobilisierung auf einem festen Träger verwendet werden.

In dieser Erfindung wird auch die Verwendung von kompetitiven Assays zum Screenen von Wirkstoffen in Betracht gezogen, bei denen neutralisierende Antikörper, die Telomerase oder (ein) Untereinheiten-Protein(e) binden können, spezifisch mit einer Testverbindung um die Bindung an Telomerase oder das Untereinheiten-Protein konkurrieren. Auf diese Weise können die Antikörper zum Nachweis des Vorhandenseins eines Peptids verwendet werden, das eine oder mehrere antigene Determinanten mit der Telomerase oder einer Protein-Untereinheit gemeinsam hat.

Weitere Verfahren zur Identifizierung von Modulatoren einer Telomerase-Aktivität sind, beschrieben in US-Patent 5 645 986 und USSN 08/151 477, eingereicht am 12. November 1993 sowie USSN 08 288 501, eingereicht am 10. August 1994, wobei diese Dokumente durch Bezugnahme als Bestandteil dieser Beschreibung angesehen werden können. Die vorliegende Erfindung stellt auch Verbesserungen von bereits bekannten Verfahren bereit, teilweise dadurch, dass Reagenzien bereitgestellt werden, beispielsweise hTRT-Polynucleotide, -Sonden und -Primer, hoch-gereinigte hTR, hTRT und Telomerase sowie anti-Telomerase- und anti-TRT-Antikörper, die alle in den Assays verwendet werden können, beispielsweise als Kontrollen, Standard-, Bindungs- oder Hybridisierungsagensien oder anderweitig.

Die rekombinant hergestellte erfindungsgemässe Telomerase und TRT (z.B. hTRT) ist natürlich in Assays zur Identifizierung von Modulatoren von Nutzen. Bei den Screening-Assays können auch Telomerase oder hTRT verwendet werden, die aus einer vollen oder partiellen Rekonstitution von Telomerase-Aktivität oder von einer Vermehrung einer existierenden Aktivität abstammen. Die durch die Erfindung bereitgestellten Assays oder Screeningverfahren können dazu verwendet werden, die Fähigkeit von Telomerase zu testen, Telomer-DNA zu synthetisieren oder für einen Test hinsichtlich einer oder aller «partiellen Aktivitäten» von hTRT und TRTs, wie vorstehend allgemein beschrieben. Der Assay kann die ex vivo-Modifizierung von Zellen beinhalten, die zur Expression von Telomerase mit oder ohne deren RNA-Einheit oder assoziierten Proteinen manipuliert wurde, und diese können in ein Tier reimplantiert werden, das für einen in vivo-Test verwendet werden kann. Somit stellt die Erfindung in vivo-Assays und dafür nützliche transgene Tiere bereit. In diesen in vivo-Assay-Systemen können «knockout»-Zellen verwendet werden, bei denen eine oder mehrere Einheiten des endogenen Telomerase-Enzym-Komplexes deletiert oder gehemmt wurden, sowie Zellen, bei denen eine exogene oder endogene Telomerase-Aktivität rekonstituiert oder aktiviert ist.

Telomerasen und TRT-Proteine, die ortsspezifisch (z.B. durch ortsgereichte Mutation) zur Modifizierung oder Deletion einer oder aller Funktionen des Telomerase-Enzyms oder des TRT-Proteins modifiziert wurden, können ebenso zur Entdeckung therapeutischer Agensien in den erfindungsgemässen Screening-Verfahren angewandt werden. Beispielsweise kann TRT so manipuliert werden, dass es seine Fähigkeit verliert, Substrat-DNA zu binden, seine RNA-Einheit (wie hTR) zu binden, die Hinzufügung von Telomer-DNA zu katalysieren, Desoxynucleotid-Substrate zu binden, nucleolytische Aktivität aufzuweisen, Telomer-assoziierte Proteine oder chromosomale Strukturen zu binden etc. Die erhaltenen «Mutanten-Proteine» oder «Muteine» können zur Identifizierung von Verbindungen verwendet werden, die eine, mehrere oder alle Funktionen oder Aktivitäten des TRT-Proteins oder der Telomerase spezifisch modulieren.

## C. Beispiele für Telomerase-Modulatoren

### 1) Allgemeines

Bei den Testverbindungen, auf die vorstehend hingewiesen wurde, kann es sich um eine grosse Vielzahl von Verbindungen handeln, sowohl natürlich vorkommende als auch synthetische, organische und anorganische Verbindungen, sowie Polymere (z.B. Oligopeptide, Polypeptide, Oligonucleotide und Polynucleotide) sowie kleine Moleküle, Antikörper (wie hier ausführlich definiert), Zucker, Fettsäuren, Nucleotide und Nucleotid-Analoga, Analoga von natürlich vorkommenden Strukturen (z.B. Peptid-«Imitatoren», Nucleinsäureanaloga etc.) und zahlreiche weitere Verbindungen.

Die Erfindung stellt alle Arten von Modulatoren bereit ohne Beschränkung auf einen bestimmten Wir-



kungsmechanismus. Zum Zweck der Veranschaulichung werden im folgenden Beispiele für Modulatoren, zu denen Verbindungen oder Behandlungen zählen, aufgelistet:

- (i) Sie binden an das hTERT-Polypeptid (z.B. das aktive Zentrum des Enzyms) oder an einen anderen Telomerasebestandteil und beeinflussen eine Telomerase-Aktivität;
- (ii) sie hemmen oder fördern die Assoziation oder hemmen oder fördern die Dissoziation eines Telomerase-Bestandteils (z.B. hTERT oder das hTERT-hTR-RNP) mit einem Telomerase-assoziierten Protein (zu denen beispielsweise die im vorgehenden Abschnitt IV(D) zählen);
- (iii) sie hemmen oder fördern die Assoziation oder hemmen oder fördern die Dissoziation von Telomerase-Polypeptiden (z.B. hTERT) mit einer Telomerase-RNA (z.B. hTR);
- (iv) sie hemmen oder fördern die Assoziation oder hemmen oder fördern die Dissoziation von Telomerase-Polypeptiden (z.B. hTERT) mit Chromosomen (z.B. Telomeren) oder chromosomaler DNA (z.B. Telomer-DNA);
- (v) sie steigern oder senken die Expression eines Genprodukts eines Telomerase-Bestandteils (z.B. Produkte des hTERT-Gens), wozu auch Veränderungen der Rate oder des Spiegels der Transkription des TRT-Gens oder der Translation zählen, der Transport oder die Stabilität eines Genprodukts etc. durch Bindung an das Gen oder Genprodukt (z.B. durch Wechselwirkung mit einem Faktor (z.B. ein die Transkription regulierendes Protein), der die Transkription des hTERT-Gens oder eines anderen Telomerase-Bestandteils beeinflusst).

## 2) Peptid-Modulatoren

- Zu den möglichen Modulatoren von Telomerase-Aktivität zählen auch Peptide (z.B. hemmende (Antagonist) und aktivierende (Agonist) Peptid-Modulatoren). Beispielsweise können Oligopeptide mit nach dem Zufallsprinzip erzeugten Sequenzen gescreent werden, um so Peptidmodulatoren (Agonisten oder Inhibitoren) von Telomerase-Aktivität auffinden zu können. Solche Peptide können direkt als Wirkstoffe verwendet werden, oder um die Orientierung oder Lage einer funktionellen Gruppe aufzufinden, die eine Telomerase-Aktivität hemmen kann, was wiederum zum Entwurf und dem Austesten eines inhibitorischen kleinen Moleküls führt, oder wobei das Peptid das Rückgrat für chemische Modifizierung wird, die dessen pharmakologischen Verwendungsmöglichkeiten steigern. Bei dem Peptid kann es sich um strukturelle «Imitatoren» handeln, und Molekülmodulierungsprogramme können verwendet werden, um «Imitatoren» basierend auf der charakteristischen Sekundär- und/oder Tertiärstruktur eines Telomerase-Enzyms und hTERT-Proteins zu entwerfen. Solche strukturellen «Imitatoren» können auch in vivo als Modulatoren von Telomerase-Aktivität (Agonisten und Antagonisten) verwendet werden. Strukturelle «Imitatoren» können auch als Immunogene zur Erzeugung von anti-Telomerase- oder anti-TRT-Protein-Antikörpern verwendet werden.

## 3) Inhibitorische natürliche Verbindungen als Modulatoren von Telomerase-Aktivität

- Darüber hinaus kann eine grosse Anzahl von möglicherweise nützlichen aktivitätsmodifizierenden Verbindungen in Extrakten von natürlichen Produkten als Ausgangsmaterial gescreent werden. Solche Extrakte können aus einer grossen Anzahl von Quellen stammen, nämlich den Spezies Pilze, Actinomyces, Algen, Insekten, Protozoen, Pflanzen und Bakterien. Die Extrakte, die inhibitorische Aktivität zeigen, können dann zur Isolierung des aktiven Moleküls analysiert werden. Siehe beispielsweise Turner, i. Ethnopharmacol. 51 (1-3) (1996), 39-43 und Suh, Anticancer Res. 15 (1995) 233-239.

## 4) Inhibitorische Oligonucleotide

- Zu einem besonders nützlichen Satz an Inhibitoren, die durch die vorliegende Erfindung bereitgestellt werden, gehören Oligonucleotide, die entweder an eine hTERT-Protein codierende mRNA binden können, oder an das hTERT-Gen, wobei in beiden Fällen die Herstellung von funktionellem hTERT-Protein verhindert oder gehemmt wird. Andere erfindungsgemässe Oligonucleotide interagieren mit der RNA-Einheit von Telomerase, beispielsweise hTR, oder können die Bindung von Telomerase oder hTERT an sein jeweiliges DNA-Ziel, oder von einem Telomerase-Bestandteil an einen anderen oder an ein Substrat verhindern. Solche Oligonucleotide können auch das Telomerase-Enzym hTERT-Protein oder Protein und RNA und, wie bereits vorstehend beschrieben, eine partielle Aktivität inhibieren (wie z.B. deren prozessive Aktivität, reverse Transkriptase-Aktivität, nucleolytische Aktivität etc.). Die Assoziation kann über eine Sequenz-spezifische Hybridisierung an eine andere Nucleinsäure oder durch eine allgemeine Bindung, wie beispielsweise einem Aptamer, oder durch beides erfolgen.

- Telomerase-Aktivität kann dadurch gehemmt werden, dass die hTERT-mRNA mit «anti-sense»-Oligonucleotiden als Ziel versehen wird, die die hTERT-mRNA binden können.

- Zu einer weiteren nützlichen Klasse von Inhibitoren zählen Oligonucleotide, die eine Inaktivierung oder Spaltung von hTERT-mRNA oder hTR bewirken. Dabei ist das Oligonucleotid chemisch modifiziert, oder weist enzymatische Aktivität auf, was solch eine Spaltung bewirkt. Zu solchen Oligonucleotiden zählen Ribozyme oder an ein Oligonucleotid gebundenes EDTA. Es kann sich auch um eine kovalente

Bindung handeln, beispielsweise Psoralen oder quervernetzende Reagenzien, die an ein Oligonucleotid gebunden sind. Wie bereits vorstehend angemerkt, kann ein Pool von vielen unterschiedlichen solcher Oligonucleotide nach solchen mit der gewünschten Aktivität gescreent werden.

5 Zu einer weiteren Klasse von nützlichen Inhibitoren zählen Oligonucleotide, die Polypeptide binden. Doppel- oder einzelsträngige DNA-Molekül oder doppel- oder einzelsträngige RNA-Moleküle, die an spezifische Polypeptidziele binden, werden «Aptamere» genannt. Die spezifische Oligonucleotid/Polypeptid-Assoziierung kann durch elektrostatische Wechselwirkungen vermittelt werden. Beispielsweise binden Aptamere spezifisch an Anionenbindende Aussenseiten auf Thrombin, das an das polyanionische Heparin physiologisch bindet (Bock, Nature 355 (1992), 564–566). Da hTRT-Protein sowohl an hTR als auch deren DNA-Substrat bindet, und da die vorliegende Erfindung hTRT- und andere TRT-Proteine in gereinigter Form in grossen Mengen bereitstellt, kann der Fachmann unter Verwendung der erfindungsgemässen Verfahren leicht nach TRT-bindenden Aptameren screenen.

Oligonucleotide (z.B. RNA-Oligonucleotide), die Telomerase, hTRT, HTR oder Anteile davon binden, können mittels der SELEX-Verfahren erzeugt werden (Tuerk, Methods Mol. Biol. 67 (1997), 2190). Bei diesem Verfahren wird ein sehr grosser Pool (106–109) aus Nucleinsäuren mit Zufallssequenzen unter Bedingungen an das Ziel (z.B. hTRT) gebunden, die einer sehr starken Unterscheidung zwischen Molekülen mit hoher Affinität und niedriger Affinität bezüglich der Bindung des Ziels führen. Die gebundenen Moleküle werden von nichtgebundenen abgetrennt und die gebundenen Moleküle kraft einer spezifischen Nucleinsäuresequenz, die in ihren Enden enthalten ist, und mittels geeigneter Amplifikationsreagenzien amplifiziert. Dieser Prozess wird verschiedene Male solange wiederholt, bis eine relativ kleine Anzahl von Molekülen übrig bleibt, die eine hohe Bindungsaffinität für das Ziel aufweisen. Diese Moleküle können im Anschluss daran auf ihre Fähigkeit Telomerase-Aktivität zu modulieren, wie hier beschrieben, getestet werden.

Antagonisten einer Telomerase-vermittelten DNA-Replikation können auch auf einer Hemmung von hTR (Norton, Nature Biotechnology 14 (1996) 615–619) über komplementäre Sequenz-Erkennung oder -Spaltung, wie dies bei Ribozymen der Fall ist, basieren.

Die erfindungsgemässen inhibitorischen Oligonucleotide können unter Verwendung einer Vielfalt von auf dem Fachgebiet gut bekannten Verfahren in die Zelle transferiert werden. Beispielsweise können Oligonucleotide spontan ohne spezifische Modifikation in das Plasma transportiert werden. In einer alternativen Ausführungsform können sie mittels Liposomen, die mit der zellulären Membran fusionieren oder durch Endocytose aufgenommen werden, zugeliefert werden, d.h. durch die Verwendung vorn an das Liposom angehefteten Liganden oder durch direkte Anheftung an das Oligonucleotid, wobei diese dann an Oberflächenmembran-Proteinrezeptoren der Zelle binden, was zu einer Endocytose führt. In einer alternativen Ausführungsform können die Zellen zur Steigerung des Transports der Oligonucleotide in die Zelle ohne Verletzung der Wirtszellen permeabilisiert werden. Es kann auch ein DNA-bindendes Protein, beispielsweise HBGF-1, von dem bekannt ist, dass es ein Oligonucleotid in eine Zelle transportieren kann, verwendet werden.

#### 5) Inhibitorische Ribozyme

Ribozyme wirken durch Bindung an eine Ziel-RNA über den die Ziel-RNA bindenden Anteil eines Ribozyms, der in enger Nachbarschaft zu einem enzymatischen Anteil der RNA gehalten wird, der die Ziel-RNA spaltet. Somit erkennt und spaltet das Ribozym eine Ziel-RNA normalerweise über Paarung mit komplementären Basen und nachdem es an der richtigen Stelle gebunden ist wirkt es als Enzym, wobei es die Ziel-RNA spaltet und inaktiviert. Die Spaltung einer Ziel-RNA auf eine solche Weise zerstört deren Fähigkeit, die Synthese eines codierten Proteins zu steuern, vorausgesetzt, die Spaltung geschieht in der codierenden Sequenz. Nachdem ein Ribozym sein RNA-Ziel gebunden und gespalten hat, wird es typischerweise von der RNA freigesetzt, so dass es wiederholt neue Ziele binden und spalten kann.

#### 6) Die Identifizierung von Telomerase-Assoziierten Proteinen zur Verwendung als Modulatoren

In einer erfindungsgemässen Ausführungsform wird die Telomerase zur Identifizierung von Telomerase-assoziierten Proteinen verwendet, d.h. Telomerase-assoziierten Proteinen, die Telomerase-Aktivität modulieren oder ansonsten ergänzen. Wie bereits vorstehend angemerkt, können diese Proteine oder Fragmente davon eine Funktion dadurch modulieren, dass sie die Dissoziation des Telomerase-Enzymkomplexes bewirken oder die Assoziation verhindern, die Assemblierung des Telomerase-Komplexes verhindern, hTRT an deren Bindung an ihre, eine ergänzende Einheit darstellende Nucleinsäure hindern oder an ihre Bindung an ihre DNA-Matrize, hTRT an der Bindung von Nucleotiden hindern, oder eine oder mehrere oder alle der Teilaktivitäten des Telomerase-Enzyms oder des hTRT-Proteins, wie bereits vorstehend beschrieben, verhindern, steigern oder hemmen.

Der Fachmann kann die erfindungsgemässen Verfahren für den Nachweis dafür verwenden, welche Anteile (z.B. Domänen) dieser Telomerase-assoziierten Proteine mit T lomerase in Kontakt kommen. In einer erfindungsgemässen Ausführungsform werden diese T lomerase-assoziierten Proteine oder Fragmente davon als Modulatoren von Telomerase-Aktivität verwendet.

## 7) Telomerase-Assoziierte Proteine als Dominant-negative Mutanten

In einer erfindungsgemässen Ausführungsform werden Telomerase-assoziierte Proteine als Modulatoren von Telomerase-Aktivität verwendet. Zu Telomerase-assoziierten Proteinen zählen chromosomale Strukturen, beispielsweise Histone, Proteine der nucleären Matrix, Kontrollproteine der Zellteilung/des Zellcyclus etc. Zu weiteren Telomerase-assoziierten Proteinen, die für den erfindungsgemässen Zweck als Modulatoren verwendet werden können! zählen p80 und p95, das menschliche Protein und ihre menschlichen Homologe, beispielsweise TP1 und TRF-1 (Chong, Science 270 (1995), 1663–1667). Zusätzlich können Fragmente dieser Telomerase-assoziierten Proteine vom Fachmann gemäss den erfindungsgemässen Verfahren identifiziert und als Modulatoren von Telomerase-Aktivität verwendet werden.

## 8) Dominant-negative Mutanten

Acht hochkonservierte Motive wurden innerhalb der TRTs verschiedener nicht-menschlicher Spezies identifiziert, wie bereits vorstehend beschrieben (siehe auch Lingner, Science 276 (1997), 561–567). Fig. 4 zeigt ein Schema der menschlichen TRT (hTRT)-codierenden cDNA-Sequenz (von pGRN121) und von RT-Motiven im Vergleich zu *S. pombe*-Trt1p, *Euplotes* p123 und *S. cerevisiae* Est2p. Die vorliegende Erfindung stellt rekombinante und synthetische Nucleinsäuren bereit, in denen die Codons für die konservierten Aminosäurereste in jedem der acht Motive gegen jedes der anderen Codons ausgetauscht wurden. Eine Vielzahl der erhaltenen codierten Sequenzen exprimieren eine nichtfunktionelle hTRT. Siehe beispielsweise Beispiel 16. Somit stellt die vorliegende Erfindung beispielsweise eine grosse Anzahl von «mutierten» Telomerase-Enzymen und TRT-Proteinen zur Verfügung, die eine Teilaktivität von Telomerase aufweisen, jedoch nicht die gesamte Aktivität. Beispielsweise kann eine solche Polymerase telomere Strukturen binden, jedoch nicht Telomerase-assoziierte RNA (d.h. hTR). Solch eine Telomerase-Mutante kann, wenn sie in ausreichend hoher Konzentration exprimiert wird, zur Verarmung eines notwendigen Telomerase-Bestandteils (z.B. hTR) führen und dadurch als ein Inhibitor von Wildtyp-Telomerase-Aktivität fungieren. Eine auf diese Weise wirkende mutierte Telomerase stellt einen Antagonisten dar oder eine sogenannte «dominant-negative» Mutante.

## 9) Antikörper

Die erfindungsgemässen Antikörper können allgemein zur Identifizierung, Reinigung oder Hemmung irgendeiner oder aller Aktivitäten eines Telomerase-Enzyms und hTRT-Proteins verwendet werden. Antikörper können als Antagonisten von Telomerase-Aktivität auf verschiedene Weise wirken, beispielsweise dadurch, dass sie verhindern, dass der Telomerase-Komplex oder das Nucleotid an deren DNA-Substrate bindet, dadurch, dass sie verhindern, dass die Telomerase-Bestandteile einen aktiven Komplex bilden, durch Aufrechterhaltung einer funktionellen (Telomerase-Komplex) quaternären Struktur oder durch Bindung an eine der aktiven Zentren des Enzyms oder an andere Stellen, die allosterische Auswirkungen auf Aktivität haben (die unterschiedlichen Teilaktivitäten von Telomerase sind ausführlich an anderer Stelle dieser Beschreibung beschrieben).

## D) Das Entwerfen von Modulatoren

Die erfindungsgemässen Telomerase-Modulatoren können mittels Verfahren, die in der Pharmazie gut bekannt sind, entworfen oder hergestellt werden, dazu gehören kombinatorische Verfahren und «rational drug design»-Verfahren.

## 1) Methodik der kombinatorischen Chemie

Die Herstellung und das simultane Screenen von grossen Banken aus synthetischen Molekülen kann mittels gut bekannter Verfahren der kombinatorischen Chemie ausgeführt werden, siehe beispielsweise van Breemen, Anal. Chem. 69 (1997), 2159–2164 und Lam, Anticancer Drug Des. 12 (1997), 145–167.

Wie bereits vorstehend angemerkt, kann die Methodik der kombinatorischen Chemie dazu verwendet werden, eine riesige Anzahl von Oligonucleotiden zu erzeugen, die hinsichtlich spezifischer Oligonucleotide, die geeignete Bindungsaffinitäten besitzen, sehr schnell gescreent werden können und Spezifitäten gegen ein beliebiges Ziel, wie die erfindungsgemässen TRT-Proteine, können genutzt werden (siehe für eine allgemeine Hintergrundinformation Gold, J. of Biol. Chem. 270 (1995), 13581–13584).

## 2) «Rational Drug Design»

«Rational drug design» beinhaltet einen integrierten Satz an Methoden, zu denen die Strukturanalyse von Zielmolekülen, synthetische Chemie und fortgeschrittene Computerverfahren zählen. Bei der Verwendung zum Entwurf von Modulator n, beispielsweise Antagonisten/Inhibitoren von Proteinzielen, wie beispielsweise das Telomerase-Enzym und hTRT-Protein, besteht das Ziel von «rational drug design» in einem Verständnis der dreidimensionalen Gestalt und der Chemie eines Moleküls. «Rational drug de-

sign» wird unterstützt von Daten, die durch Röntgenstrukturanalyse oder NMR gewonnen wurden und die nun für das hTERT-Protein und Telomerase-Enzym gemäss den durch die Erfindung bereitgestellten Verfahren und unter Verwendung der erfindungsgemässen Reagenzien bestimmt werden können. Hilfreich sind auch Berechnungen hinsichtlich elektrostatischer Eigenschaften, Hydrophobizitäten und der Lösungsmittelzugänglichkeit. Siehe beispielsweise Coldren, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94 (1997), 6635–6640.

#### D) Kits

Die Erfindung stellt auch Kits bereit, die zu einer Bestimmung dafür verwendet werden können, ob eine Testverbindung ein Modulator einer TRT-Aktivität ist. Der Kit beinhaltet typischerweise eine oder mehrere der folgenden Bestandteile: ein im wesentlichen gereinigtes TRT-Polypeptid oder Polynucleotid (einschliesslich Sonden und Primern), ein Plasmid, das eine TRT (z.B. hTERT) exprimieren kann, wenn es in eine Zelle oder ein zellfreies Expressionssystem eingeführt wird; ein Plasmid, das eine TR (z.B. hTR) exprimieren kann, wenn es in eine Zelle oder ein zellfreies Expressionssystem eingeführt wird; Zellen oder Zelllinien; eine Zusammensetzung zum Nachweis einer Veränderung in einer TRT-Aktivität und eine Anleitung die zeigt, wie eine Veränderung in der TRT-Aktivität nachgewiesen und gemessen werden kann, wobei angezeigt wird, dass eine Änderung in der Telomerase-Aktivität in Gegenwart der Testverbindung ein Indikator dafür ist, ob die Testverbindung die Telomerase-Aktivität moduliert und ein Behälter. Der Kit kann auch Mittel enthalten, wie beispielsweise ein TRAP-Assay oder ein Assay, der auf einer quantitativen Polymerase-Kettenreaktion beruht, um so eine Änderung in einer TRT-Aktivität messen zu können. Der Kit kann auch eine Anleitung dafür enthalten, wie eine Veränderung in der TRT-Aktivität nachgewiesen und gemessen werden kann, wobei angezeigt wird, dass eine Veränderung in der Telomerase-Aktivität in Anwesenheit der Testverbindung ein Indikator dafür ist, ob die Testverbindung die Telomerase-Aktivität moduliert.

#### XI. Transgene Organismen (Telomerase-«knockout»-Zellen und Tiermodelle)

Die Erfindung stellt auch transgene nicht-menschliche mehrzellige Organismen (z.B. Pflanzen und Tiere) oder einzellige Organismen (z.B. Hefe) bereit, die eine exogene TRT-Gensequenz enthalten, bei der es sich um eine codierende Sequenz oder eine regulatorische Sequenz (z.B. einen Promotor) handeln kann. In einer Ausführungsform exprimiert der Organismus ein exogenes TRT-Polypeptid mit einer Sequenz von einem menschlichen TRT-Protein. In einer verwandten Ausführungsform exprimiert der Organismus auch einen Telomerase-RNA-Bestandteil (z.B. hTR).

Die Erfindung stellt auch einzellige und mehrzellige Organismen (oder Zellen davon) bereit, bei denen mindestens ein, eine Telomerase-Untereinheit (z.B. TRT oder TR) oder ein Telomerase-assoziiertes Protein codierendes Gen mutiert oder deletiert ist (d.h. in einem codierenden oder regulatorischen Bereich), so dass keine native Telomerase exprimiert wird oder diese mit einem herabgesetzten Spiegel exprimiert oder im Vergleich zu Wildtypzellen oder Organismen mit unterschiedlichen Aktivitäten exprimiert wird. Solche Zellen und Organismen werden oft als «gene knock-out»-Zellen oder -Organismen bezeichnet.

Die Erfindung stellt ferner Zellen und Organismen bereit, bei denen ein endogenes Telomerase-Gen (z.B. Maus-TRT) mutiert oder deletiert ist und ein exogenes Telomerase-Gen (z.B. für menschliche TRT) eingeführt und exprimiert wird. Zellen und Organismen dieses Typs sind beispielsweise als Modellsysteme von Nutzen, um: Modulatoren von hTERT-Aktivität oder -Expression zu identifizieren; die Auswirkungen von Mutationen in Genen für Telomerase-Bestandteile bestimmen zu können und beispielsweise das Timing im Hinblick auf den Entwicklungszustand und die Gewebelokalisierung von Telomerase-Aktivität bestimmen zu können (um beurteilen zu können, wann ein Telomerase-Modulator verabreicht werden soll und um mögliche Nebenwirkungen feststellen zu können).

Zu den Beispielen für mehrzellige Organismen gehören Pflanzen, Insekten und Tiere, wie beispielsweise Mäuse, Ratten, Kaninchen, Affen, Menschenaffen, Schweine und andere Säuger. Ein Beispiel für einen einzelligen Organismus ist Hefe.

Verfahren zur Änderung oder Unterbrechung eines spezifischen Gens (z.B. endogener TRT-Gene) sind dem Fachmann gut bekannt, siehe beispielsweise Baudin et al., Nucl. Acids Res. 21 (1993), 3329; Wach et al., Yeast 10 (1994) 1793; Rothstein, Methods Enzymol. 194 (1991), 281; Anderson, Methods Cell Biol. 48 (1995), 31; Pettitt et al., Development 122 (1996), 4149–4157; Ramirez-Solis et al., Methods Enzymol. 225 (1993), 855 und Thomas et al., Cell 51 (1987), 503, wobei jedes dieser Dokumente durch Bezugnahme in seiner Gesamtheit und für alle Zwecke als Bestandteil der Beschreibung anzusehen ist.

Zu den erfindungsgemässen «knockout»-Zellen und -Tieren gehören Zellen und Tiere, in denen eine oder mehrere Einheiten des endogenen Telomerase-Enzymkomplexes deletiert oder gehemmt sind. Die Rekonstitution von Telomerase-Aktivität bewahrt die Zelle oder das Tier vor dem unvermeidlichen Zelltod, der durch dessen Unvermögen, Telomere zu bewahren, bedingt ist. Verfahren zur Änderung der Expression von endogenen Genen sind dem Fachmann gut bekannt. Typischerweise beinhalten solche Verfahren die Veränderung oder den Austausch aller regulatorischen Sequenzen, die die Expression ei-

nes bestimmten zu regulierenden Gens kontrollieren, oder eines Anteils davon. Die regulatorischen Sequenzen, beispielsweise der native Promotor, können verändert werden. Das übliche Verfahren für eine zielgerichtete Mutation von Genen beinhaltet die Einfügung eines, das gewünschte Gen enthaltenden genomischen DNA-Fragments in einen Vektor, wonach sich die Clonierung von zwei genomischen Armen um eine selektierbare Neomycin-Resistenzkassette in einem Thymidinkinase enthaltenden Vektor anschließt. Mit diesem «knock-out»-Konstrukt wird dann eine geeignete Zelle transfiziert, d.h. eine embryonale Stammzelle (ES) der Maus, wobei die Zellen danach einer positiven Selektion (mittels G418 und beispielsweise auf Neomycin-Resistenz zu selektieren) und einer negativen Selektion (wobei beispielsweise FIAU verwendet wird, um Zellen auszuschliessen, denen Thymidinkinase fehlt) unterworfen werden. Dies erlaubt die Selektion von Zellen, die mit dem «knockout»-Vektor eine homologe Rekombination eingegangen sind. Dieses Vorgehen führt zur Inaktivierung des gewünschten Gens. Siehe beispielsweise die US-Patente 5 464 764; 5 631 153; 5 487 992 und 5 627 059.

«Knocking out»-Expression eines endogenen Gens kann auch erreicht werden mittels homologer Rekombination, die zur Einführung einer heterologen Nucleinsäure in die regulatorischen Sequenzen (z.B. einen Promotor) des gewünschten Gens verwendet wird. Um die Expression von funktionellem Enzym oder Produkt zu verhindern, sind einfache Mutationen geeignet, die entweder den Leserahmen ändern oder den Promotor unterbrechen. Zur Hochregulation der Expression kann ein nativer Promotor gegen einen heterologen Promotor ausgetauscht werden, der höhere Transkriptionsspiegel induziert. Es kann auch die «gene trap insertion» verwendet werden, um ein Wirtsgen zu unterbrechen. Embryonale Stammzellen (ES) der Maus können zur Herstellung von transgenen «knockout»-Tieren verwendet werden wie dies beispielsweise in Holzschu Transgenic Res. 6 (1997), 97–106 beschrieben ist.

Die Änderung der Expression von endogenen Genen durch homologe Rekombination kann auch unter Verwendung von Nucleinsäuresequenzen erreicht werden, die das fragliche Strukturen enthalten. Stromaufwärts gelegene Sequenzen werden dafür verwendet, um Konstrukte bezüglich einer heterologen Rekombination zum Ziel zu führen. Unter Verwendung der Information hinsichtlich des TRTStrukturgens, beispielsweise SEQ. ID. Nr. 1, kann der Fachmann Konstrukte für eine homologe Rekombination herstellen, was lediglich Routineexperimente erforderlich macht. Homologe Rekombination zur Änderung der Expression von endogenen Genen ist beschrieben in US-Patent Nr. 5,272,071 und WO 91/09 955, WO 93/09 222, WO 96/29 411, WO 95/31 560 und WO 91/12 650. Homologe Rekombination in Mycobakterien ist beschrieben in Azad Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93 (1996), 4787; Baulard, J. Bacteriol. 178 (1996), 3091 und Pelicic, Mol. Microbiol. 20 (1996), 991. Homologe Rekombination in Tieren ist beschrieben von Moynahan, Hum. Mol. Genet. 5 (1996), 875 und in Pflanzen von Offringa, EMBO J. 9 (1990) 3077.

## XI. Glossar

Die folgenden Bezeichnungen werden nachstehend definiert, um dem Fachmann bei der Ausführung der Erfindung eine zusätzliche Anleitung zu geben: Adjuvans, Allel (& Allelsequenz), Aminosäuren (einschliesslich hydrophobe, polare, geladene), konservative Substitution, Kontrollelemente (und regulatorische Sequenzen), derivatisiert, nachweisbare Markierung, erhöhter Spiegel, Epitop, günstige und ungünstige Prognose, Fusionsprotein, Genprodukt, hTR, unsterblich, Immunogen und immunogen, isoliert, Modulator, Motiv, Nucleinsäure (& Polynucleotid), Oligonucleotide (& Oligomere), funktionell verknüpft, Polypeptide, Sonde (einschliesslich Nucleinsäuresonden und Antikörpersonden), rekombinant, Selektionssystem, Sequenz, spezifische Bindung, stringente Hybridisierungsbedingungen (& Stringenz), wesentliche Identität (& wesentliche Ähnlichkeit), im wesentlichen rein (& im wesentlichen gereinigt), Telomerase-negative und Telomerase-positive Zellen, katalytische Aktivität von Telomerase, Telomeraseverwandt und Testverbindung.

Der hier verwendete Ausdruck «Adjuvans» betrifft in seiner normalen Bedeutung jede Substanz, die die Immunantwort gegenüber einem Antigen, mit dem es vermischt ist, erhöht. Zu den für die vorliegende Erfindung nützlichen Adjuvantien gehören, jedoch ohne Beschränkung darauf, Freund's Adjuvans, Mineralgele, wie Aluminiumhydroxid, und oberflächenaktive Substanzen, beispielsweise Lysolecithin, pluronische Polyole, Polyanionen, Peptide, Ölemulsionen, «Keyhole limpet»-Hemocyanin und Dinitrophenol. BCG («Bacillus Calmette-Guerin») und Corynebacterium parvum sind ebenfalls nützliche Adjuvantien.

Die hier verwendete Bezeichnung «Allel» oder «Allelsequenz» betrifft eine alternative Form einer Nucleinsäuresequenz (d.h. einer hTRT-Protein codierenden Nucleinsäure). Allele sind das Ergebnis von Mutationen (d.h. Änderungen in der Nucleinsäuresequenz) und es kommt dadurch im allgemeinen zur Herstellung veränderter und/oder unterschiedlich regulierter mRNAs oder Polypeptide, deren Struktur und/oder Funktion geändert sein kann oder nicht. Übliche auf Mutationen beruhende Änderungen, die zur Entstehung von Allelen führen, werden allgemein natürlichen Deletionen, Additionen oder Substitutionen von Nucleotiden zugeschrieben, die die codierten Aminosäuren beeinflussen können oder auch nicht. Jede Art dieser Änderung kann allein vorkommen, in Kombination mit den anderen oder einmal oder öfter innerhalb eines gegebenen Gens, Chromosoms oder einer anderen zellulären Nucleinsäure. Jedes gegebene Gen kann keine, eine oder viele Allel-Formen haben. Die hier verwendete Bezeichnung für «Allel» bezieht sich entweder auf ein Gen oder eine von dem Gen transkribierte mRNA oder beides.

Die hier beschriebenen «Aminosäuren» werden gelegentlich durch den Standard-Einbuchstabencode bezeichnet: Alanin (A), Serin (S), Threonin (T), Asparaginsäure (D), Glutaminsäure (E), Asparagin (N), Glutamin (Q), Arginin (R), Lysin (K), Isoleucin (I), Leucin (L), Methionin (M), Valin (V), Phenylalanin (F), Tyrosin (Y), Tryptophan (W), Prolin (P), Glycin (G), Histidin (H), Cystein (C). Dazu zählen auch synthetische und nicht-natürlich vorkommende Aminosäure-Analoga (und/oder Peptidverknüpfungen).

Der hier verwendete Ausdruck «hydrophobe Aminosäuren» bezieht sich auf A, L, I, V, P, F, W und M. Der hier verwendete Ausdruck «polare Aminosäuren» bezieht sich auf G, S, T, Y, C, N und Q. Der hier verwendete Ausdruck «geladene Aminosäuren» bezieht sich auf D, E, H, K und R.

Der hier verwendete Ausdruck «konservative Substitution» bezieht sich bei der Beschreibung eines Proteins auf eine Veränderung in der Aminosäurezusammensetzung des Proteins, die die Aktivität des Proteins nicht wesentlich verändert. Somit bezieht sich der Ausdruck «konservativ modifizierte Variationen» einer bestimmten Aminosäuresequenz auf Aminosäuresubstitutionen, bei denen Aminosäuren ausgetauscht sind, die für die Proteinaktivität nicht kritisch sind, oder auf die Substitution von Aminosäuren gegen andere Aminosäuren mit ähnlichen Eigenschaften (sauer, basisch, positiv oder negativ geladen, polar oder nicht-polar etc.), so dass die Substitutionen selbst von kritischen Aminosäuren die Aktivität nicht wesentlich ändern. Tabellen hinsichtlich konservativer Substitution, die funktionell ähnliche Aminosäuren aufzählen, sind auf dem Fachgebiet gut bekannt. Die folgenden sechs Gruppen enthalten jeweils Aminosäuren, die gegenüber einander konservative Substitutionen darstellen: 1) Alanin (A), Serin (S), Threonin (T); 2) Asparaginsäure (D) Glutaminsäure (E) 3) Asparagin (N), Glutamin (Q); 4) Arginin (R), Lysin (K), 5) Isoleucin (I), Leucin (L) Methionin (M); Valin (V); und 6) Phenylalanin (F), Tyrosin (Y), Tryptophan (W) (siehe auch Creighton, Proteins, (1984), W.H. Freeman and Company). Für den Fachmann ist es offensichtlich, dass die vorstehend angegebenen Austausche nicht die einzigen möglichen konservativen Substitutionen darstellen. Beispielsweise könnte man den Austausch einer geladenen Aminosäure gegen eine andere geladene Aminosäure als konservative Substitution erachten, unabhängig davon, ob sie positiv oder negativ geladen ist. Zusätzlich sind individuelle Substitutionen, Deletionen oder Additionen, die eine einzelne Aminosäure oder einen kleinen Prozentsatz von Aminosäuren in einer codierten Sequenz ändern, hinzufügen oder deletieren, ebenfalls «konservativ modifizierte Variationen». Eine «konservative Substitution» kann in ein rekombinantes Protein dadurch eingeführt werden, dass ein oder mehrere Codons verwendet werden, die sich von den Codons unterscheiden, die von dem nativen Gen oder Wildtyp-Gen verwendet werden. In diesem Fall beinhaltet eine konservative Substitution auch die Substitution eines Codons für eine Aminosäure gegen ein anderes Codon für dieselbe Aminosäure.

Die hier verwendeten Bezeichnungen «Kontrollelemente» oder «regulatorische Sequenzen» beinhalten Enhancer, Promotoren, Transkriptionsterminatoren, Replikationsursprünge, chromosomalintegrierte Sequenzen, 5'- und 3'- nicht translatierte Bereiche, mit denen Proteine oder andere Biomoleküle zur Durchführung von Transkription und Translation interagieren. Bei eukaryotischen Zellen enthalten die Kontrollsequenzen einen Promotor und vorzugsweise einen Enhancer, der beispielsweise von Immunglobulinen, SV40, Cytomegalovirus stammt, und eine Polyadenylierungssequenz. Sie können auch Donor- und Akzeptor-Sequenzen für die Spleissung enthalten. Je nach verwendetem Vektorsystem und verwendetem Wirt kann eine beliebige Anzahl von geeigneten Transkriptions- und Translationselementen zu denen auch konstitutive und induzierbare Promotoren gehören, verwendet werden.

Die hier verwendete Bezeichnung «derivatisierte(s)» Polynucleotid, Oligonucleotid oder Nucleinsäure bezieht sich auf ein Oligo- oder Polynucleotid, das einen derivatisierten Substituenten umfasst. In einigen Ausführungsformen ist der Substituent im wesentlichen hinsichtlich der Hybridisierung mit komplementären Polynucleotiden nicht störend. Derivatisierte Oligo- oder Polynucleotide, die mit hinzugefügten chemischen Substituenten modifiziert wurden (z.B. durch Modifikation eines bereits synthetisierten Oligo- oder Polynucleotids oder durch Einbau einer modifizierten Base oder eines Rückgrat-Analogen während der Synthese) können in eine metabolisch aktive eukaryotische Zelle eingeführt werden, um mit einer hTERT-DNA, -RNA oder einem hTERT-Protein zu hybridisieren, wobei sie eine Veränderung oder chemische Modifikation an einer dortigen DNA, RNA oder einem dortigen Protein erzeugen. In einer alternativen Ausführungsform können die derivatisierten Oligo- oder Polynucleotide mit hTERT-Polypeptiden, Telomerase-assoziierten Proteinen oder anderen Faktoren, die mit hTERT-DNA oder hTERT-Genprodukten interagieren, in Wechselwirkung treten und diese ändern, oder die Expression oder Funktion von hTERT-DNA oder -RNA oder -Proteinen ändern oder modulieren. Zu den Beispielen für angeknüpfte chemische Substituenten zählen: Europium (III) texaphyrin, quervernetzende Mittel, Psoralen, Metallchelate (z.B. Eisen/EDTA-Chelat für eine Eisen-katalysierte Spaltung), Topoisomerasen, Endonucleasen, Exonucleasen, Ligasen, Phosphodiesterasen, photodynamische Porphyrine, chemotherapeutische Wirkstoffe (z.B. Adriamycin, Doxorubicin), interkalierende Mittel, Basen-modifizierende Mittel, Immunglobulinketten und Oligonucleotide. Eisen/EDTA-Chelate sind chemische Substituenten, die oft dann verwendet werden, wenn eine lokale Spaltung einer Polynucleotidsequenz erwünscht ist (Hertzberg et al., J. Am. Chem. Soc. 104 (1982), 313; Hertzberg und Dervan, Biochemistry 23 (1984), 3934; Taylor et al., Tetrahedron 40 (1984), 457 und Dervan, Science 232 (1986), 464). Zu Beispielen von chemischen Verfahren zur Anknüpfung zählen: direkte Verbindung z.B. über eine angehängte reaktive Aminogruppe (Corey und Schultz, Science 238 (1988), 1401, wobei dieses Dokument durch Bezugnahme als Bestandteil dieser Beschreibung anzusehen ist) und andere chemische Verfahren für direkte Verbindungen, wobei aller-

dings auch Verbindungsverfahren für Streptavidin/Biotin und Digoxigenin/anti-Digoxigenin-Antikörper verwendet werden können. Verfahren zur Kopplung chemischer Substituenten werden bereitgestellt in den US-Patenten 5 135 720, 5 093 245, und 5 055 556, die aufgrund der Bezugnahme als Bestandteil dieser Beschreibung angesehen werden können. Andere chemische Kopplungsverfahren liegen im Ermessen des Fachmanns.

Die hier verwendete Bezeichnung «nachweisbare Markierung» besitzt die auf dem Fachgebiet übliche Bedeutung und betrifft ein Atom (z.B. ein Radionuclid), Molekül (z.B. Fluorescein) oder einen Komplex, der dafür verwendet wird oder dafür verwendet werden kann, um die Anwesenheit eines Moleküls nachzuweisen (z.B. aufgrund einer physikalischen oder chemischen Eigenschaft) oder anzuzeigen, oder um die Bindung eines anderen Moleküls zu ermöglichen, an das es kovalent gebunden oder eng assoziiert ist. Die Bezeichnung «Markierung» bezieht sich auch auf kovalent gebundene oder eng assoziierte Moleküle (z.B. ein Biomolekül, beispielsweise ein Enzym), das auf ein Substrat zur Erzeugung eines nachweisbaren Atoms, Moleküls oder Komplexes einwirkt. Zu den für die erfindungsgemässe Verwendung geeigneten nachweisbaren Markierungen zählen alle Zusammensetzungen, die durch spektroskopische, photochemische, biochemische, immunochemische, elektrische, optische oder chemische Mittel nachweisbar sind. Zu den für die vorliegende Erfindung nützlichen Markierungen gehören Biotin zur Anfärbung mit markiertem Streptavidin-Konjugat, magnetische Kügelchen (z.B. Dynabeads), Fluoreszenzfarbstoffe (z.B. Fluorescein, Texas-rot, Rhodamin, grün-fluoreszierendes Protein («greenfluorescent protein»), verstärktes grün-fluoreszierendes Protein («enhanced green fluorescent protein»), Lissamin, Phycoerythrin, Cy2, Cy3, Cy3.5, Cy5, Cy5.5, Cy7, «FluorX» (Amersham), «SyBR Green I & II» (Molecular Probes), etc.), radioaktive Markierungen (z.B.  $^3\text{H}$ ,  $^{125}\text{I}$ ,  $^{35}\text{S}$ ,  $^{14}\text{C}$  oder  $^{32}\text{P}$ ), Enzyme (z.B. Hydrolasen, insbesondere Phosphatasen, wie beispielsweise alkalische Phosphatase, Esterasen und Glycosidasen oder Oxidoreductasen, insbesondere Peroxidasen, wie beispielsweise Meerrettichperoxidase und andere üblicherweise in einem ELISA verwendete Enzyme), Substrate, Cofaktoren, Inhibitoren, chemilumineszente Gruppen, chromogene Mittel und colorimetrische Markierungen, wie beispielsweise kolloidales Gold oder gefärbte Glas- oder Plastik (z.B. Polystyrol, Polypropylen, Latex etc.) Kügelchen. Zu denen Patenten, deren Lehre die Verwendung solcher Markierungen betrifft, zählen US-Patent 3 817 837; 3 850 752; 3 939 350; 3 996 345; 4 277 437; 4 275 149 und 4 366 241. Mittel zum Nachweis solcher Markierungen sind dem Fachmann gut bekannt. Somit können beispielsweise radioaktive Markierungen und chemilumineszente Markierungen mittels eines photographischen Films oder Szintillationszählern nachgewiesen werden und Fluoreszenzmarker können zum Nachweis von emittiertem Licht mit einem Photodetektor (z.B. bei der Fluoreszenz aktivierten Zellsortierung) nachgewiesen werden. Enzymatische Markierungen werden typischerweise dadurch nachgewiesen, dass das Enzym mit einem Substrat versehen wird und dass durch die Wirkung des Enzyms auf das Substrat das erzeugte Reaktionsprodukt nachgewiesen wird. Colorimetrischen Markierungen werden einfach durch Sichtbarmachung der gefärbten Markierung nachgewiesen. Somit ist eine Markierung jede Zusammensetzung, die durch spektroskopische, photochemische, biochemische, immunochemische, elektrische, optische oder chemische Mittel nachweisbar ist. Die Markierung kann an den gewünschten Assay-Bestandteil gemäss auf dem Fachgebiet gut bekannter Verfahren direkt oder indirekt gekoppelt werden. Nicht radioaktive Markierungen werden oft durch indirekte Mittel angebracht. Im allgemeinen ist ein Ligandenmolekül (z.B. Biotin) kovalent an das Molekül gebunden. Der Ligand bindet dann ein anti-Ligandenmolekül (z.B. Streptavidin), das entweder inhärent nachweisbar ist oder an ein ein Signal erzeugendes System kovalent gebunden ist, wie beispielsweise ein nachweisbares Enzym, eine fluoreszierende Verbindung oder eine chemilumineszierende Verbindung. Es kann eine Reihe von Liganden und anti-Liganden verwendet werden. In den Fällen, in denen ein Ligand einen natürlichen anti-Liganden aufweist, beispielsweise Biotin, Thyroxin oder Cortison, kann er in Verbindung mit den markierten, natürlich vorkommenden anti-Liganden verwendet werden. Alternativ kann jedes Hapten oder jede antigene Verbindung in Kombination mit einem Antikörper verwendet werden. Die Moleküle können auch direkt an signalerzeugende Verbindungen konjugiert sein, beispielsweise durch Konjugation mit einem Enzym oder Fluorophor. Mittel zum Nachweis von Markierungen sind dem Fachmann gut bekannt. Somit zählen beispielsweise dann, wenn die Markierung eine radioaktive Markierung ist, zu den Nachweismitteln ein Szintillationszähler, photographischer Film, wie bei der Autoradiographie, oder eine Bildgebung mittels gespeichertem Phosphor («storage phosphor imaging»). Eine Fluoreszenzmarkierung kann durch Anregung des Fluorchroms mit Licht einer geeigneten Wellenlänge und dem Nachweis der erhaltenen Fluoreszenz nachgewiesen werden. Die Fluoreszenz kann visuell nachgewiesen werden, mit Hilfe eines photographischen Films, mittels eines elektronischen Detektors, wie beispielsweise ladungsgekoppelte Vorrichtungen (CCDs) oder Sekundärelektronenvervielfacher etc. Auf ähnliche Weise können enzymatische Markierungen dadurch nachgewiesen werden, dass für das Enzym die geeigneten Substrate bereitgestellt werden, und das erhaltene Reaktionsprodukt nachgewiesen wird. Auch können einfache colorimetrische Markierungen durch die Beobachtung der mit der Markierung assoziierten Farbe nachgewiesen werden. Wenn Paare von Fluorophoren in einem Assay verwendet werden, wird es oft bevorzugt, dass diese unterschiedliche Emissionsmuster (Wellenlängen) besitzen, so dass sie leicht unterschieden werden können.

Die Bezeichnung «erhöhter Spiegel» bezieht sich auf eine Menge an hTERT-Genprodukt (oder einer anderen angegebenen Substanz oder Aktivität) in einer Zelle, die erhöht ist, oder höher im Vergleich mit dem Spiegel in einem Referenzstandard, zu dem Spiegel in normalen Telomerasenegativen Zellen in ei-



ner Person oder in anderen Personen, die nicht an dem entsprechenden Zustand leiden, beispielsweise für eine Diagnose, und für eine Prognose, zum Spiegel in Tumorzellen von einer Reihe von Stadien, oder Klassen von beispielsweise Tumoren.

Der hier verwendete Ausdruck «Epitop» hat seine übliche Bedeutung, d.h. er bezieht sich auf eine Stelle auf einem Antigen, die von einem Antikörper erkannt wird. Epitope sind typische Abschnitte von Aminosäuren, die einen kleinen Anteil des Gesamtproteins darstellen. Epitope können die Konformation betreffen (d.h. diskontinuierlich). Das heisst, sie können durch Aminosäuren gebildet werden, die von nichtzusammenhängenden Teilen an Primersequenz codiert werden, und die aufgrund der Proteinfaltung nebeneinander zu liegen kommen.

Die Bezeichnungen «günstige Prognose» und «ungünstige Prognose» sind auf dem Fachgebiet bekannt. Im Zusammenhang mit Krebs bedeutet «günstige Prognose», dass sich ein Tumor wahrscheinlich zurückbilden wird, oder längere Überlebenschancen für Patienten mit einer günstigen Prognose bestehen im Vergleich zu denen mit einer ungünstigen Prognose, während der Ausdruck «ungünstige Prognose» bedeutet, dass der Tumor wahrscheinlich aggressiver ist, was zu einem schlechten Krankheitsverlauf für den Patienten führt oder einem schnellerem Fortschreiten der Krankheit.

Der hier verwendete Ausdruck «Fusionsprotein» bezieht sich auf ein zusammengesetztes Protein, d.h. eine einzelne zusammenhängende Aminosäuresequenz, die aus zwei (oder mehreren) unterschiedlichen heterologen Polypeptiden aufgebaut ist, die normalerweise nicht in einer einzigen Aminosäuresequenz zusammen fusioniert sind. Somit kann ein Fusionsprotein eine einzelne Aminosäuresequenz beinhalten, die zwei vollkommen verschiedene Aminosäuresequenzen enthält oder zwei ähnliche oder identische Polypeptidsequenzen, vorausgesetzt, dass diese Sequenzen normalerweise nicht zusammen in einer einzigen Aminosäuresequenz aufgefunden werden. Fusionsproteine können allgemein unter Verwendung entweder von Nucleinsäure-Rekombinationsverfahren hergestellt werden, d.h. als das Ergebnis von Transkription und Translation eines rekombinanten Genfusionsprodukts, wobei die Fusion einen Abschnitt umfasst, der ein erfindungsgemässes Polypeptid codiert und einen Abschnitt, der ein heterologes Protein codiert, oder durch auf dem Fachgebiet allgemein bekannte chemische Syntheseverfahren. Der (Die) nicht-hTERT-Bereich(e) des Fusionsproteins können an den Aminoterminus des hTERT-Polypeptids, den Carboxy-Terminus oder beide fusioniert werden.

Der hier verwendete Ausdruck «Genprodukt» bezieht sich auf ein von einem Gen transkribiertes RNA-Molekül oder ein Protein, das von dem Gen codiert oder von der RNA translatiert wird.

Der hier verwendete Ausdruck «hTR» (menschliche Telomerase-RNA) bezieht sich auf den RNA-Bestandteil von menschlicher Telomerase und aller natürlich vorkommender Allele und Varianten oder rekombinate Varianten. hTR wird ausführlich in dem US-Patent Nr. 5 583 016 beschrieben, das durch Bezugnahme in seiner Gesamtheit und für alle Zwecke als Bestandteil dieser Beschreibung angesehen werden kann.

Der hier verwendete Ausdruck «unsterblich» hat, wenn er sich auf eine Zelle bezieht, seine normale Bedeutung auf dem Telomerase betreffenden Fachgebiet und bezieht sich auf Zellen, die ein offensichtlich unbegrenztes replikatives Potential besitzen. Der Ausdruck «unsterblich» kann sich auch auf Zellen mit erhöhter Proliferationsfähigkeit im Vergleich zu ihren unmodifizierten Gegenstücken beziehen. Beispiele für unsterbliche menschliche Zellen sind maligne Tumorzellen, Keimbahnzellen und bestimmte transformierte menschliche Zelllinien, die in vitro kultiviert sind (z.B. Zellen, die nach Transformation durch virale Oncogene unsterblich wurden). Im Gegensatz dazu sind die meisten normalen menschlichen somatischen Zellen sterblich, d.h. sie besitzen ein begrenztes replikatives Potential und werden nach einer ähnlichen Zahl von Zellteilungen senescent.

Die hier verwendeten Ausdrücke «Immunogen» und «immunogen» haben die auf diesem Fachgebiet übliche Bedeutung, d.h. ein Immunogen ist ein Molekül, beispielsweise ein Protein oder ein anderes Antigen, das eine adaptive Immunantwort nach Injektion in eine Person oder ein Tier auslöst.

Der hier verwendete Ausdruck «isoliert» bedeutet, wenn er sich auf ein Molekül oder eine Zusammensetzung bezieht, beispielsweise auf ein RNP (z.B. mindestens ein Protein und mindestens eine RNA), dass das Molekül oder die Zusammensetzung von mindestens einer weiteren Verbindung (z.B. ein Protein, andere RNAs oder andere Verunreinigungen mit denen es in vivo oder in seinem natürlich vorkommenden Status assoziiert ist, abgetrennt wurde. Somit wird ein RNP dann als «isoliert» angesehen, wenn er beispielsweise von einer Zellmembran, beispielsweise aus einem Zellextrakt, isoliert wurde. Eine isolierte Zusammensetzung kann jedoch auch im wesentlichen rein sein.

Der hier verwendete Begriff «Modulator» bezieht sich auf jede synthetische oder natürliche Verbindung oder Zusammensetzung, die auf beliebige Weise sowohl die «volle» oder jede «Teilaktivität» einer Telomerase-reversen Transkriptase (TRT) verändern kann. Ein Modulator kann ein Agonist oder ein Antagonist sein. Ein Modulator kann, allerdings ohne Beschränkung darauf, eine beliebige organische oder anorganische Verbindung sein. Dazu gehören beispielsweise kleine Moleküle, Peptide, Proteine, Zucker, Nucleinsäure, Fettsäuren etc. Die hier verwendete Bezeichnung «Motiv» bezieht sich auf eine Sequenz von aufeinanderfolgenden Aminosäuren (oder auf eine Nucleinsäuresequenz, die eine Sequenz von aufeinanderfolgenden Aminosäuren codiert), die ein Merkmal oder eine Struktur in einem Protein definiert, die allen Proteinen einer definierten Klasse oder eines definierten Typs gemeinsam ist, oder innerhalb dieser Proteine konserviert ist. Das Motiv oder die «Konsensus»-Sequenz können sowohl konservierte als auch nicht-konservierte Reste enthalten, die konservierten Reste in der Motivse-



quenz zeigen jedoch an, dass der konservierte Rest oder die Klasse von Resten (d.h. hydrophob, polar, nicht-polar oder eine andere Klasse) typischerweise an der angegebenen Position in jedem Protein (oder Gen oder mRNA) der Klasse von Proteinen, die durch das Motiv definiert sind, vorhanden ist. Motive können sich entsprechend der Proteinklasse unterscheiden. Somit bilden beispielsweise die reverse Transkriptase-Enzyme eine Klasse von Proteinen, die durch eines oder mehrere Motive definiert sein kann und zu dieser Klasse gehören auch Telomerase-Enzyme. Die Telomerase-Enzyme können jedoch als die Klasse von Enzymen mit Motiven definiert werden, die für diese Klasse charakteristisch sind. Es ist für den Fachmann offensichtlich, dass die Identifizierung eines Restes als konservierter Rest in einem Motiv nicht bedeutet, dass jedes Mitglied der durch das Motiv definierten Klasse diesen angegebenen Rest (oder Klasse von Resten) an der angegebenen Position aufweist und dass eines oder mehrere Mitglieder der Klasse einen unterschiedlichen Rest an der konservierten Position besitzen kann (können).

Die hier verwendeten Ausdrücke «Nucleinsäure» und «Polynucleotid» werden gegenseitig austauschbar verwendet. Bei der Verwendung des Ausdrucks «Polynucleotid» ist der Ausschluss von Oligonucleotiden (d.h. kurzen Polynucleotiden) nicht beabsichtigt und dieser Ausdruck kann sich auch auf synthetische und/oder nicht-natürlich vorkommende Nucleinsäuren beziehen (d.h. Nucleinsäure-Analoga oder modifizierte Rückgratreste oder Bindungen umfassen).

Die hier verwendeten Ausdrücke «Oligonucleotide» oder «Oligomere» beziehen sich auf eine Nucleinsäuresequenz aus etwa 7 Nucleotiden oder mehr und bis zu etwa 700 Nucleotiden, die als eine Sonde oder «Amplimer» verwendet werden können. Oligonucleotide weisen vorzugsweise eine Länge von zwischen etwa 10 und etwa 50 Nucleotiden auf, mehr bevorzugt von etwa 14 bis etwa 35 Nucleotiden und am meisten bevorzugt von etwa 15 bis etwa 25 Nucleotiden und dieser Ausdruck kann sich auch auf synthetische und/oder nicht natürlich vorkommende Nucleinsäuren beziehen (d.h. Nucleinsäure-Analoga oder modifizierte Rückgratreste oder Bindungen umfassen).

Der hier verwendete Ausdruck «funktionell verknüpft» bezieht sich auf eine funktionelle Beziehung zwischen zwei oder mehr Nucleinsäuresegmenten (z.B. DNA): Beispielsweise ist ein Promotor oder Enhancer mit einer codierenden Sequenz funktionell verknüpft, wenn er die Transkription der Sequenz in einer geeigneten Wirtszelle oder einem anderen Expressionssystem stimuliert. Sequenzen, die funktionell verknüpft sind, sind im allgemeinen aufeinanderfolgend und im Fall einer Signalsequenz sowohl aufeinanderfolgend und im Leserahmen. Enhancer müssen jedoch nicht in enger Nachbarschaft zu den codierenden Sequenzen, deren Transkription sie erhöhen sollen, gelegen sein.

Der hier verwendete Ausdruck «Polypeptid» und die Bezeichnung «Protein» werden gegenseitig austauschbar verwendet und beziehen sich auf ein Polymer, das aus Aminosäureresten zusammengesetzt ist, wozu synthetische, natürlich vorkommende und nicht natürlich vorkommende Analoga davon zählen. Peptide sind Beispiele für Polypeptide.

Der hier verwendete Ausdruck «Sonde» bezieht sich auf ein Molekül, das ein anderes Molekül spezifisch bindet. Ein Beispiel einer Sonde ist eine «Nucleinsäuresonde», die an eine im wesentlichen komplementäre Nucleinsäure spezifisch bindet (d.h. sich anlagert oder hybridisiert). Ein weiteres Beispiel einer Sonde ist eine «Antikörper-Sonde», die an ein entsprechendes Antigen oder Epitop spezifisch bindet.

Der hier verwendete Ausdruck «rekombinant» bezieht sich auf ein Polynucleotid, das in vitro synthetisiert oder auf andere Weise manipuliert wurde (z.B. ein «rekombinantes Polynucleotid»), auf Verfahren, die sich auf die Verwendung rekombinanter Polynucleotide zur Herstellung von Genprodukten in Zellen oder anderen biologischen Systemen beziehen oder auf ein Polypeptid («rekombinantes Protein»), das von einem rekombinanten Polynucleotid codiert wird.

Der hier verwendete Ausdruck «Selektionssystem» bezieht sich im Zusammenhang mit stabil transformierten Zelllinien auf ein Verfahren zur Identifizierung und/oder Selektion von Zellen, die eine gewünschte rekombinante Nucleinsäure enthalten. Eine grosse Vielzahl von Selektionssystemen zur Identifizierung von transformierten Zellen ist bekannt und diese sind zur Anwendung bei der vorliegenden Erfindung geeignet. Beispielsweise können durch Plasmide oder andere Vektoren transformierte Zellen durch die Resistenz gegen Antibiotika selektiert werden, die durch auf den Plasmiden enthaltene Gene verliehen wird, beispielsweise die gut bekannten Gene *amp*, *gpt*, *neo* und *hyg* oder andere Gene, wie beispielsweise die Herpes simplex-Virus-Thymidinkinase-Gene (Wigler et al., Cell 11 (1977), 223-32 und das Adeninphosphoribosyltransferasegen (Lowy et al., Cell 22 (1980), 817), die in *tk*- bzw. *aprt*-Zellen verwendet werden können. Auch die Resistenz gegen einen Antimetaboliten, ein Antibiotikum oder Herbizid kann als Basis für eine Selektion verwendet werden; beispielsweise *dhfr*, das Resistenz gegen Metotrexat verleiht und auch für eine Genamplifikation von Nutzen ist (Wigler et al. Proc. Natl. Acad. Sci., 77 (1980), 3567); *npt*, das Resistenz gegen die Aminoglykoside Neomycin und G-418 verleiht (Colbere-Garapin et al., J. Mol. Biol. 150 (1981), 1) und *als* oder *pat*, die Resistenz gegen Chlorsulfuron bzw. Phosphinotricin-Acetyltransferase verleihen (Murry, in McGraw Hill Yearbook of Science and Technology, McGraw Hill, New York NY, Seiten 191-196 (1992)). Es werden weitere selektierbare Gene beschrieben, beispielsweise *trpB*, in Gen das Hygromycin-Resistenz verleiht und Zellen erlaubt anstelle von Tryptophan Indol zu verwenden, oder *hisD*, das es Zellen erlaubt anstelle von Histidin Histinol zu verwenden (Hartman und Mulligan, Proc. Natl. Acad. Sci., 85 (1988), 8047). Erst kürzlich hat die Verwendung von sichtbaren Markern grosse Popularität erreicht, wobei solche Marker wie Anthocyanine,  $\beta$ -

Glucuronidase und dessen Substrat, GUS und Luciferase und dessen Substrat, Luciferin, nicht nur zur Identifizierung von Transformanten beide Verwendung finden sondern auch zur Quantifizierung der Menge von transienter oder stabiler Proteinexpression, die einem spezifischen Vektorsystem zugeschrieben werden kann (Rhodes et al., Meth. Mol. Biol. 55 (1995), 121).

Der hier verwendete Ausdruck «Sequenz» eines Gens, einer Nucleinsäure, eines Proteins oder Peptids bezieht sich (falls nicht spezifisch anders angegeben) auf die Anordnung von Nucleotiden entweder in einem Strang oder beiden Strängen eines doppelsträngigen DNA-Moleküls, beispielsweise auf die Sequenz sowohl des codierenden Strangs als auch des dazu komplementären Strangs, oder in einem einzelsträngigen Nucleinsäuremolekül, oder auf die Anordnung von Aminosäuren in einem Peptid oder Protein.

Der hier verwendete Ausdruck «spezifisch bindend» bezieht sich auf die Fähigkeit eines Moleküls, typischerweise eines Antikörpers oder Polynucleotids, mit einem anderen spezifischen Molekül selbst in Gegenwart von vielen anderen unterschiedlichen Molekülen in Kontakt zu kommen und zu assoziieren. Beispielsweise kann ein einzelsträngiges Polynucleotid spezifisch an ein einzelsträngiges Polynucleotid, das in seiner Sequenz komplementär ist, spezifisch binden, und ein Antikörper bindet spezifisch an sein korrespondierendes Antigen (oder «ist spezifisch immunreaktiv damit»).

Der hier verwendete Ausdruck «stringente Hybridisierungsbedingungen» oder «Stringenz» bezieht sich auf Bedingungen im Bereich von etwa 5°C bis etwa 20°C oder 25°C unter der Schmelztemperatur ( $T_m$ ) der Zielsequenz und einer Sonde mit einer exakten oder fast exakten Komplementarität zum Ziel. Der hier verwendete Ausdruck «Schmelztemperatur» bezieht sich auf die Temperatur, bei der eine Population von doppelsträngigen Nucleinsäuremolekülen halb in Einzelstränge dissoziiert. Verfahren zur Berechnung des  $T_m$  von Nucleinsäuren sind auf dem Fachgebiet allgemein bekannt (siehe z.B. Berger und Kimmel (1987) *Methods in Enzymology*, Bd. 152: *Guide to Molecular Cloning Techniques*, San Diego: Academic Press, Inc. und Sambrook et al., (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2. Ausgabe, Bände 1–3, Cold Spring Harbor Laboratory (nachstehend als «Sambrook» bezeichnet), wobei beide Dokumente aufgrund der Bezugnahme als Bestandteil dieser Beschreibung angesehen werden können). Wie in Standardreferenzen angegeben, kann eine einfache Bestimmung des  $T_m$ -Wertes anhand der Gleichung:  $T_m = 81,5 + 0,41 (\% G + C)$  berechnet werden, wenn eine Nucleinsäure sich in wässriger Lösung bei 1 M NaCl befindet (siehe z.B. Anderson und Young, *Quantitative Filter Hybridization in: Nucleic Acid Hybridization* (1985)). Andere Referenzen enthalten verfeinerte Berechnungen, wobei sowohl strukturellen Merkmalen als auch Sequenzmerkmalen bei der Berechnung des  $T_m$  Rechnung getragen wird. Die Schmelztemperatur eines Hybrids (und somit die Bedingungen für eine stringente Hybridisierung) werden durch verschiedene Faktoren beeinflusst, beispielsweise die Länge und Art (DNA, RNA, Basenzusammensetzung) der Sonde und der Art des Ziels (DNA, RNA, Basenzusammensetzung, in Lösung vorhanden oder immobilisiert etc.) und der Konzentration von Salzen und anderen Bestandteilen (z.B. das Vorhandensein oder Fehlen von Formamid, Dextransulfat, Polyethylenglykol). Die Auswirkungen dieser Faktoren sind allgemein bekannt und werden in Standardreferenzen bezüglich dieses Fachgebiets diskutiert; siehe z.B. Sambrook, a.a.O., und Ausubel et al., a.a.O. Typischerweise entsprechen stringente Hybridisierungsbedingungen Salzkonzentrationen unter etwa 1,0 M Natriumionen, typischerweise etwa 0,01 bis 1,0 M Natriumionen bei einem pH-Wert von 7,0 bis 8,3 und Temperaturen von mindestens etwa 30°C für kurze Sonden (z.B. 10 bis 50 Nucleotide) und mindestens etwa 60°C für lange Sonden (z.B. über 50 Nucleotide). Wie bereits angemerkt, können stringente Bedingungen auch durch die Zugabe von destabilisierenden Mitteln wie beispielsweise Formamid erreicht werden, wobei in diesem Fall niedrigere Temperaturen angewandt werden können.

Der hier verwendete Ausdruck «wesentliche Sequenzidentität» im Zusammenhang mit Nucleinsäuren bezieht sich auf das Ausmass von Sequenzähnlichkeit zwischen zwei Polynucleotiden. Wesentliche Sequenzidentität kann durch Hybridisierung unter stringenten Bedingungen, durch direkten Vergleich oder andere Massnahmen bestimmt werden. Beispielsweise können zwei Polynucleotide als wesentliche Sequenzidentität aufweisend identifiziert werden, wenn sie miteinander unter stringenten Hybridisierungsbedingungen spezifisch hybridisieren können. Andere Grade an Sequenzidentität (z.B. weniger als «wesentlich» können durch Hybridisierung unter unterschiedlichen Stringenz-Bedingungen charakterisiert werden. Alternativ kann wesentliche Sequenzidentität als ein Prozentsatz an Identität zwischen zwei Nucleotidsequenzen (oder Polypeptidsequenzen) beschrieben werden. Zwei Sequenzen werden dann als wesentlich identisch erachtet, wenn sie zu mindestens etwa 60% identisch sind, bevorzugt mindestens etwa 70%, mindestens etwa 80%, mindestens etwa 90% oder mindestens etwa 95 oder 98 bis 100%. Die prozentuale Sequenzidentität (Nucleotid oder Aminosäure) wird typischerweise durch Bestimmung der optimalen Ausrichtung zwischen zwei Sequenzen oder durch Vergleichen der zwei Sequenzen berechnet. Beispielsweise kann ein für eine «sense»-Suppression verwendetes exogenes Transkript als ein bestimmter Prozentsatz an Identität oder Ähnlichkeit im Vergleich zu einer Referenzsequenz (z.B. der korrespondierenden endogenen Sequenz) aufweisen, beschrieben werden. Die optimale Ausrichtung von Sequenzen kann unter Verwendung des Algorithmus von Smith und Waterman, *Adv. Appl. Math.* 2 (1981), 482, der sich auf die lokale Homologie bezieht («local homology algorithm») durchgeführt werden, durch den Algorithmus, der sich auf die Homologie-Ausrichtung bezieht, («homology alignment algorithm») von Needleman und Wunsch, *J. Mol. Biol.* 48 (1970), 443, durch das «search for similarity»-Verfahren von Pearson und Lipman, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85 (1988), 2444, durch Ausführung die-

ser Algorithmen mittels Computer (GAP, BESTFIT, FASTA und TFASTA in dem Softwar -Paket von Wisconsin Genetics, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, WI) oder durch Betrachtung. Die beste Ausrichtung (die den höchsten Prozentsatz an Identität ergibt), die durch die verschiedenen Verfahren erzeugt wurde, wird ausgewählt. Typischerweise verglichen diese Algorithmen zwei Sequenzen über ein «Vergleichsfenster» (normalerweise mit einer Läng von mindestens 18 Nucleotiden) um so lokale Bereiche an Sequenzähnlichkeit identifizieren und vergleichen zu können, wobei klein Additionen oder Deletionen (d.h. Lücken) erlaubt sind. Additionen und Deletionen betragen typischerweise 20% oder weniger der Länge der Sequenz relativ zu der Referenzsequenz, die keine Additionen oder Deletionen enthält. Es ist gelegentlich wünschenswert, Sequenzidentität zwischen zwei Sequenzen im Bezug auf eine bestimmte Länge oder einen bestimmten Bereich zu beschreiben (z.B. können zwei Sequenzen als mindestens 95% Identität über eine Länge von mindestens 500 Basenpaaren aufweisend beschrieben werden). Normalerweise beträgt die Länge mindestens etwa 50, 100, 200, 300, 400 oder 500 Basenpaare, Aminosäuren oder andere Reste. Der Prozentsatz an Sequenzidentität wird durch Vergleich zweier optimal ausgerichteter Sequenzen über den Vergleichsbereich berechnet, die Bestimmung der Anzahl an Positionen, an denen die identischen Nucleinsäurebase (z.B. A, T, C, G oder U) in beiden Sequenzen vorkommt, um so die Anzahl an gepaarten Positionen zu ermitteln, und durch Bestimmung der Anzahl (oder des Prozentsatzes) an gepaarten Positionen im Vergleich zu der Gesamtanzahl von Basen in der Referenzsequenz oder der Vergleichsregion. Ein zusätzlicher Algorithmus, der für die Bestimmung von Sequenzähnlichkeit geeignet ist, ist der BLAST-Algorithmus, der beschrieben ist in Altschul, J. Mol. Biol. 215 (1990), 403-410 und Shpaer, Genomics 38 (1996), 179-191. Software zur Durchführung von BLAST-Analysen ist öffentlich erhältlich bei National Center for Biotechnology Information (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Dieser Algorithmus beinhaltet zuerst die Identifizierung von Sequenzpaaren mit denen viele Treffer erreicht werden («high scoring sequence pairs, HSPs») durch die Identifizierung kurzer Wörter mit der Länge W in der Abfragesequenz, die mit einem positiv bewerteten Punkt T übereinstimmen oder diesen erfüllen, wenn sie gegen ein Wort derselben Länge in einer Datenbanksequenz ausgerichtet werden. T bezieht sich auf die «neighborhood word score threshold» (Altschul et al., a.a.O.). Diese anfänglichen Treffer des Nachbarschaftsworts wirken als Ausgangspunkte für die Initiierung von Suchvorgängen, die zur Auffindung von längeren, diese enthaltenden HSPs führen sollen. Die Worttreffer werden in beiden Richtungen entlang jeder Sequenz verlängert, soweit der Treffer bezüglich der kumulativen Ausrichtung erhöht werden kann. Die Verlängerung der Worttreffer in jeder Richtung kommt zum Stillstand, wenn: der Treffer bezüglich der kumulativen Ausrichtung verringert sich um die Menge X von dem maximal erreichbaren Wert; der kumulative Treffer geht gegen 0 oder darunter aufgrund der Akkumulation von einer oder mehreren Ausrichtungen von negative Treffer erzielenden Resten; oder das Ende jeder Sequenz ist erreicht. Die Parameter W, T und X des BLAST-Algorithmus bestimmen die Empfindlichkeit und die Schnelligkeit der Ausrichtung. Das BLAST-Programm verwendet als Voreinstellung eine Wortlänge (W) von 11, die «BLOSUM62 scoring matrix» (siehe Henikoff, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89 (1992), 10915-10919), Ausrichtungen (B) von 50, Erwartung (E) von 10, M = 5, N = -4, und eines Vergleichs beider Stränge. Der Ausdruck BLAST bezieht sich auf den BLAST-Algorithmus, der eine statistische Analyse der Ähnlichkeit zwischen zwei Sequenzen durchführt; siehe beispielsweise Karlin, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90 (1993), 5873-5787. Eine durch den BLAST-Algorithmus gelieferte Ähnlichkeitsmessung ist die kleinste Wahrscheinlichkeit der Summe («smallest sum probability») (P(N)), die die Wahrscheinlichkeit anzeigt, mit der eine Paarung zwischen zwei Nucleotiden oder Aminosäuresequenzen zufällig vorkommen würde. Beispielsweise kann eine Nucleinsäure als zu einer TRT-Nucleinsäure ähnlich erachtet werden, wenn die kleinste Wahrscheinlichkeit der Summe («smallest sum probability») beim Vergleich der Test-Nucleinsäure mit einer TRT-Nucleinsäure weniger als etwa 0,5, 0,2, 0,1, 0,01 oder 0,001 ist. Alternativ ist ein anderes Anzeichen dafür, dass zwei Nucleinsäuresequenzen ähnlich sind, dass das Polynucleotid, das die erste Nucleinsäure codiert, mit dem von der zweiten Nucleinsäure codierten Polypeptid immunologisch kreuzreagiert.

Die hier verwendeten Ausdrücke «wesentliche Identität» oder «wesentliche Ähnlichkeit» im Zusammenhang mit einem Polypeptid bezieht sich auf den Grad an Ähnlichkeit zwischen zwei Polypeptiden, bei denen ein Polypeptid eine Sequenz mit mindestens 70%, 80%, 85% oder bis zu 100% Sequenzidentität umfasst, bezogen auf eine Referenzsequenz oder am meisten bevorzugt 90% Identität über ein Vergleichsfenster von etwa 10 bis 20 Aminosäureresten. Aminosäuresequenzähnlichkeit oder Sequenzidentität wird durch Optimierung der Paarung der Reste bestimmt, falls nötig durch die Einführung von Lücken, soweit dies erforderlich ist. Siehe Needleham et al., J. Mol. Biol 48 (1970), 443-453; Sankoff et al. (1983) Time Warps, String Edits, and Macromolecules: The Theory and Practice of Sequenze Comparison, Kapitel Eins, Addison-Wesley, Reading, MA; und Software-Pakete von IntelliGenetics, Mountain View, CA und der University of Wisconsin Genetics Computer Group, Madison, WI. Es ist für den Fachmann offensichtlich, dass die Bezeichnungen «wesentliche Identität», «wesentliche Ähnlichkeit» und «wesentliche Sequenzidentität» bezüglich Polypeptiden oder Polynucleotiden gegenseitig austauschbar verwendet werden können.

Der hier verwendete Ausdruck «wesentlich rein» oder «wesentlich gereinigt» bedeutet dann, wenn er sich auf eine Zusammensetzung bezieht, die ein angegebenes Reagens enthält, beispielsweise ein n Antikörper (z.B. einen anti-hTRT-Antikörper), dass das angegebene Reagens mindestens etwa 75%, mindestens etwa 90%, mindestens etwa 95%, mindestens etwa 99% oder mehr der Zusammensetzung

(ohne beispielsweise Puffer) darstellt. Somit ist beispielsweise eine bevorzugte erfindungsgemässe Immunglobulin-Präparation, die spezifisch ein hTRT-Polypeptid bindet, im wesentlichen gereinigt.

Wie hier verwendet, ist eine «Telomerase-negative» Zelle eine Zelle, in der Telomerase nicht exprimiert wird, d.h. es kann keine katalytische Aktivität von Telomerase unter Verwendung eines üblichen Assays oder eines TRAP-Assays für katalytische Aktivität von Telomerase nachgewiesen werden. Wie hier verwendet, ist eine «Telomerase-positive» Zelle eine Zelle, in der Telomerase exprimiert wird (d.h. Telomerase-Aktivität kann nachgewiesen werden).

Wie hier verwendet, ist eine «mit Telomerase in Zusammenhang stehende» Krankheit oder ein Zustand eine Krankheit oder ein Zustand in einem Versuchsobjekt, die (der) mit einem anormal hohen Spiegel an Telomerase-Aktivität in Zellen des Versuchsobjekts korreliert, wobei dies jede Telomerase Aktivität für die meisten normalen somatischen Zellen umfassen kann, oder die (der) mit einem niedrigen Spiegel an Telomerase-Aktivität korreliert, der zu einer Beeinträchtigung einer normalen Zellfunktion führt. Zu den Beispielen für mit Telomerase in Zusammenhang stehende Zustände gehören beispielsweise Krebs (hohe Telomerase-Aktivität in malignen Zellen) und Unfruchtbarkeit (geringe Telomerase-Aktivität in Keimbahnzellen).

Der hier verwendete Ausdruck «Testverbindung» bezieht sich auf jede synthetische oder natürliche Verbindung oder Zusammensetzung. Zu diesem Ausdruck zählen alle organischen und anorganischen Verbindungen einschliesslich beispielsweise kleine Moleküle, Peptide, Proteine, Zucker, Nucleinsäuren, Fettsäuren etc.

## XII. Beispiele

Die folgenden Beispiele dienen der Veranschaulichung der vorliegenden Erfindung und sollen keine Einschränkung darstellen.

In den folgenden Abschnitten werden die folgenden Abkürzungen verwendet: eq (Äquivalente); M (Molar);  $\mu$ M (Mikromolar); N (Normal), Mol (Mole), mMol (Millimole)  $\mu$ Mol (Mikromole); nMol (Nanomole); g (Gramm), mg (Milligramm);  $\mu$ g (Mikrogramm), ng (Nanogramm); l oder L (Liter), ml (Milliliter),  $\mu$ l (Mikroliter); cm (Zentimeter); mm (Millimeter);  $\mu$ m (Mikrometer), nm (Nanometer);  $^{\circ}$ C (Grad Celsius); RPN (Ribonucleoprotein); remN(2'-O-Methylribonucleotide); dNTP (Desoxyribonucleotid); dH<sub>2</sub>O (destilliertes Wasser); DDT (Dithiothreitol); PMSF (Phenylmethylsulfonylfluorid); TE (10 mM Tris-HCl; 1 mM EDTA, pH-Wert etwa 7,2); KGlu (Kaliumglutamat); SSC (Salz- und Natriumcitratpuffer); SDS (Natriumdodecylsulfat); PAGE (Polyacrylamidgelelektrophorese); Novex (Novex, San Diego, CA); BioRad (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA), Pharmacia (Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ), Boehringer-Mannheim (Boehringer-Mannheim Corp., Concord, CA); Amersham (Amersham, Inc., Chicago, IL); Stratagene (Stratagene Cloning Systems, La Jolla, CA); NEB (New England Biolabs, Beverly, MA); Pierce (Pierce Chemical Co., Rockford IL); Beckman (Beckman Instruments, Fullerton, CA), Lab Industries (Lab Industries, Inc., Berkeley, CA), Eppendorf (Eppendorf Scientific, Madison, WI); und Molecular Dynamics (Molecular Dynamics, Sunnyvale, CA).

### Beispiel 1

#### Isolierung von Telomerase-Proteinen und -Clonen

Das folgende Beispiel beschreibt ausführlich die Isolierung von Telomerase-Proteinen und -Clonen von verschiedenen Organismen, einschliesslich der hTRT- und *S. pombe*-Telomerase-DNA-Clone

#### A. Hintergrund

##### i) Einführung

Der Abschnitt gibt einen Überblick über die Reinigung und Clonierung, die in nachfolgenden Abschnitten dieses Beispiels ausführlicher beschrieben werden. Telomerase-RNA-Untereinheiten wurden zwar in Ciliaten, Hefe und Säugern identifiziert, vor der vorliegenden Erfindung wurden jedoch Protein-Untereinheiten des Enzyms als solche nicht identifiziert. Die Reinigung von Telomerase von dem Protozoan *Euplotes aediculatus* ergab zwei Proteine, die mit p123 und p43 bezeichnet werden (siehe nachstehend; Lingner, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93 (1996) 10712). *Euplotes aediculatus* ist ein hypotricher Ciliat mit einem Macronucleus, der etwa  $8 \times 10^7$  Telomere und etwa  $3 \times 10^5$  Telomerasemoleküle enthält. Nach der Reinigung zeigte der aktive Telomerase-Komplex ein Molekulargewicht von etwa 230 kD, was einer RNA-Untereinheit von 66 kD und zwei Proteinen von etwa 123 kD und 43 kD entspricht (siehe vorstehend Lingner (1996)). Experimente mit Photo-Quervernetzung zeigten an, dass das grössere p123-Protein an der spezifischen Bindung des Telomer-DNA-Substrats beteiligt war (Lingner (1996), a.a.O.).

Die p123- und p43-Proteine wurden sequenziert und die diese Proteine codierenden cDNA-Clone isoliert. Es stellte sich heraus, dass diese *Euplotes*-Sequenzen mit den Telomerase-assoziierten Proteinen von *Tetrahymena* p80 und p95 nicht verwandt sind. Die Sequenzanalyse des *Euplotes*-p123 ergab die Anwesenheit von Motiven von reverser Transkriptase (RT). Weiterhin wurde durch die Sequenzanalyse

des Euplot s p123 ein homologes Hefeprotein gefunden, das als Est2-Protein bezeichnet wird (Lingner, Science 276 (1997), 561). Es konnte kürzlich gezeigt werden, dass das Hefe-Est2 für die Aufrechterhaltung von Telomeren in vivo essentiell ist (Lendvay, Genetics 144 (1996), 1399), es wurde jedoch nicht als ein katalytisches Telomerase-Protein identifiziert. Ortsgerichtete Mutagenese zeigte, dass die RT-Motive von Hefe-Est2 für die Synthese von Telomer-DNA in vivo und in vitro essentiell sind (Lingner (1997) a.a.O.).

## ii) Identifizierung und Charakterisierung von *S. pombe*-Telomerase

Die PCR-Amplifikation von *S. pombe*-DNA wurde mit degenerierten Sequenzprimern, die nach den Euplot s p123-RT-Motiven, wie nachstehend beschrieben, entworfen wurden, durchgeführt. Eines der erzeugten vier Haupt-PCR-Produkte war eine Bande von 120 Basenpaaren, die eine zu p123 und Est2 homologe Peptidsequenz codierte. Dieses PCR-Produkt wurde als Sonde bei Koloniehybridisierung verwendet und damit konnten zwei überlappende Clone aus einer genomischen Bank von *S. pombe* und drei von einer cDNA-Bank von *S. pombe* identifiziert werden. Die Sequenzanalyse ergab, dass keiner der drei *S. pombe*-cDNA-Clone eine vollständige Länge auswies, deshalb wurde zum Erhalt von Sequenzen, die den N-Terminus des Proteins codieren, reverse Transkriptase (RT)-PCR verwendet.

Die vollständige Sequenzierung dieser Clone zeigte ein vermutliches *S. pombe*-Telomerase-RT-Gen, trt1. Die vollständige Nucleotidsequenz von trt1 wurde bei GenBank mit der Zugangsnummer AF015783 hinterlegt. Die Analyse der Sequenz ergab, dass trt1 ein basisches Protein mit einem geschätzten Molekulargewicht von 116 kD codiert. Es zeigte sich, dass die Homologie zu p123 und Est2 in den sieben reverse Transkriptase-Motiven aussergewöhnlich hoch war. Diese Motive sind unterstrichen und als Motive 1, 2, A, B, C, D und E bezeichnet (siehe Fig. 1). Es wurde ein zusätzliches Telomerase-spezifisches Motiv gefunden, das als T-Motiv bezeichnet wurde. 15 Introns im Grössenbereich von 36 bis 71 Basenpaaren unterbrechen die codierende Sequenz.

Um *S. pombe*-trt1 als eine katalytische Untereinheit zu testen, wurden zwei Deletionskonstrukte erzeugt. Bei einem wurden nur die Motive B bis D in den RT-Domänen entfernt. Bei dem zweiten wurden 99% des offenen Leserahmens entfernt.

Haploide Zellen, die aus *S. pombe*-Sporen von beiden Mutanten gewachsen waren, zeigten fortschreitende Telomer-Kürzung bis zu dem Punkt, an dem eine Hybridisierung an Telomer-Wiederholungseinheiten praktisch nicht mehr nachweisbar war. Ein trt1<sup>+</sup>/trt1<sup>-</sup>-Diploid wurde sporulieren gelassen und die erhaltenen Tetraden wurden gegliedert und auf einem Hefeextrakt-Medium, das mit Aminosäure supplementiert war, auskeimen gelassen (eine YES-Platte, Alfa, (1993) Experiments with Fission Yeast, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY). Die von jeder Spore erhaltenen Kolonien wurden 3 Tage bei 32°C gezüchtet und alle drei Tage auf frischen YES-Platten ausgestrichen. Eine Kolonie aus jeder Runde wurde bei 32°C in 6 ml einer YES-Flüssigkultur gegeben und bis zur stationären Phase gezüchtet. Es wurde genomische DNA präpariert. Nach der Spaltung mit Apal wurde die DNA auf einem 2,3%igem Agarosegel elektrophoretisiert, zur Bestätigung, dass in jeder Spur etwa gleiche Mengen gegeben wurden, mit Ethidiumbromid angefärbt, danach auf eine Nylon-Membran transferiert und mit einer Telomer-DNA-Sonde hybridisiert.

Seneszenz wurde angezeigt durch den verzögerten Beginn der Unfähigkeit auf Agar wachsen zu können (typischerweise beim vierten Ausstreichen nach der Keimung), durch Kolonien mit Rändern, die in zunehmendem Masse ausgefranst waren (die Koloniemorphologie ist in Fig. 22B gezeigt) und durch eine hohe Anzahl von Fraktionen verlängerter Zellen, die immer mehr zunahm (wie in Fig. 22C gezeigt). Zellen wurden auf Minimalmedium (Alfa, (1993), a.a.O.), wobei Glutaminsäure gegen Ammoniumchlorid ausgetauscht war, 2 Tage bei 32°C vor dem Photographieren ausplattiert.

Bei der Trennung einzelner vergrösserter Zellen unter dem Dissektions-Mikroskop zeigte sich, dass die Mehrheit der Zellen keiner weiteren Teilung unterlag. Die gleiche Telomerase-negative (trt1<sup>-</sup>) Zellpopulation enthielt immer Zellen mit normaler Grösse, die fortfuhren sich zu teilen, jedoch häufig sich nicht teilende Nachkommen hervorbrachten. Die Telomerase-negativen überlebenden Zellen könnten einen Rekombinationsmodus der Telomer-Bewahrung verwenden, wie dies für knospende Hefestämme dokumentiert wurde, mit denen verschiedene Gene für die Telomer-Replikation deletiert sind (Lendvay (1996) a.a.O. und Lundblad Cell 73 (1993), 347).

## iii) Die Identifizierung und Charakterisierung von menschlicher Telomerase

Ein von menschlicher Telomerase-reverse Transkriptase (hTERT)-cDNA stammendes EST (exprimierte Sequenz-«tag») wurde durch eine BLAST-Suche der dbEST (exprimierte Sequenz-«tag») Gen-Bank-Datenbank identifiziert und als Genbank AA28196 bezeichnet, wobei die Euplot s-123 kD Peptid und die entsprechenden Nucleinsäuresequenzen sowie das Schizosaccharomyces-Protein und korrespondierende cDNA (tez1)-Sequenzen verwendet wurden. Das AA28196 EST weist eine Länge von 389 Nucleotiden auf und die Positionen seiner Reste in dem hTERTcDNA-Clon (Fig. 16) liegen zwischen den Resten 1679 bis 2076. Ein die EST-Sequenz enthaltender Clon, der die Bezeichnung Clon #712562 (Fig. 18) trägt, wurde von dem I.M.A.G.E.-Consortium (Human Genome Center, DOE, Lawrence Livermore National Laboratory, Livermore, CA) erhalten. Dieser Clon wurde aus einer cDNA-

Bank von aufkeimenden B-Zellen erhalten, die aus einer FlieBssortierung («flow sorting») von Mandelzellen stammten. Die vollständige Sequenzierung dieses hTERT-cDNA-Clons ergab die Anwesenheit aller acht Telomerase-RT(TRT)-Motive, wie dies in Fig. 1 gezeigt ist. Dieser hTERT-Clon codierte keinen aneinandergrenzenden Bereich von TRT, da die RT-Motive B', C, D und E im Vergleich zu den mehr N-terminal gelegenen RT-Motiven in einem anderen offenen Leserahmen enthalten waren. Zusätzlich war die Entfernung zwischen den RT-Motiven A und B wesentlich geringer als die der drei bereits bekannten (nicht-menschlichen) TRTs.

Um einen cDNA-Clon mit vollständiger Länge isolieren zu können, wurde eine cDNA-Bank, die von der menschlichen Zelllinie 293 (die vorstehend beschrieben wurde) stammt, die hohe Spiegel an Telomerase-Aktivität exprimiert, gescreent. Eine lambda-cDNA-Bank von der Zelllinie 293 wurde in 25 Pools aufgeteilt, die jeweils etwa 200 000 Plaques enthielten. Jeder Pool wurde mittels PCR mit den Primerpaaren 5'-CGGAAGAGTGTCTGGAGCAA-3' und 5'-GGATGAAGCGGAGTCTGGA-3' gescreent. Sechs Sub-Pools eines positiven primären Pools wurden mittels PCR unter Verwendung desselben Primerpaars weiter gescreent. Sowohl bei dem Screenen des primären Pools und des sekundären Sub-Pools wurde hTERT mit insgesamt 31 Cyclen amplifiziert, 45 Sekunden bei 94°C, 45 Sekunden bei 60°C und 90 Sekunden bei 72°C. Als Kontrolle wurde RNA des «house-keeping»-Enzyms GAPDH mittels der Primerpaare 5'-CTCAGACACCATGGGGAAGGTGA-3' und 5'-ATGATCTTGAGGCTGTTGTCATA-3' mit insgesamt 16 Cyclen amplifiziert, jeweils 45 Sekunden bei 94°C, 45 Sekunden bei 55°C und 90 Sekunden bei 72°C.

Ein hTERT-positiver Sub-Pool aus dem sekundären Screenen wurde dann mittels Plaque-Hybridisierung mit einer Sonde von dem 5'-Bereich von Clon #712562 gescreent. Ein Phage konnte als positiv identifiziert werden (mit der Bezeichnung Lambda-Phage 25-1.1, ATCC 209024, hinterlegt am 12. Mai 1997). Er enthielt eine Insertion von etwa 4 Kilobasen, diese wurde ausgeschnitten und in die EcoRI-Stelle des «Bluescript II SK+»-Vektors (Stratagene, San Diego, CA) als ein EcoRI-Fragment subcloniert. Dieses den cDNA-Clon enthaltende Plasmid erhielt die Bezeichnung pGRN121. Die cDNA-Insertion weist insgesamt eine Länge von etwa 4 Kilobasenpaaren auf. Die vollständige Nucleotidsequenz der menschlichen hTERT-cDNA (pGRN121) wurde bei Genbank hinterlegt (Zugangsnummer AF015950) und bei der ATCC mit der Zugangsnummer ATCC 209016 am 6. Mai 1997.

#### B. Züchtung von *Euplotes aediculatus*

Die in diesem Beispiel verwendeten Kulturen von *E. aediculatus* wurden von Dr. David Prescott, MCDB, University of Colorado, erhalten. Dr. Prescott isolierte diese Kultur ursprünglich aus Wasser eines Teichs, dieser Organismus ist aber auch von der ATCC erhältlich (ATCC #30859). Kulturen wurden wie von Swanton et al., (Swanton et al., Chromosoma 77 (1980), 203) in 15-Liter-Glasbehältern gezüchtet, die Chlorogonium als eine Nahrungsquelle enthielten. Die Organismen wurden nach Erreichen einer Dichte von etwa 10<sup>4</sup> Zellen/ml von den Kulturen geerntet.

#### C. Präparation von nucleären Extrakten

In diesem Beispiel wurden nucleäre Extrakte von *E. aediculatus* mittels des Verfahrens von Lingner et al., (Lingner et al., Genes Develop. 8 (1994) 1984) mit den nachstehend beschriebenen geringen Modifikationen präpariert. Zusammengefasst wurden Zellen, die wie in Teil B beschrieben gezüchtet wurden, mit 15 µm Nytex-Filtern konzentriert und auf Eis gekühlt. Das Zellpellet wurde zu einem Endvolumen von 110 ml TMS/PMSF/Spermidinphosphat-Puffer resuspendiert. Der TMS/PMSF/Spermidinphosphat-Vorratspuffer wurde durch Zugabe von 0,075 g Spermidinphosphat (USB) und 0,75 ml PMSF (aus einer in Ethanol hergestellten 100 mM Vorratslösung) zu 150 ml TMS hergestellt. TMS enthielt 10 mM Tris-Acetat, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 85,5752 g Saccharose/Liter und 0,33297 g CaCl<sub>2</sub>/Liter, pH-Wert 7,5.

Nach Resuspendierung in TMS/PMSF/Spermidinphosphat-Puffer wurden 8,8 ml 10% NP-40 und 94,1 g Saccharose zugegeben. Das Gemisch wurde in einen silikonisierten Glasbecher mit einem Rührstab aus rostfreiem Stahl, der an einem darüber befindlichen Motor angebracht war, gegeben. Das Gemisch wurde gerührt, bis die Zellen vollständig lysiert waren (etwa 20 Minuten). Das Gemisch wurde dann 10 Minuten bei 7500 UpM (8950 × g) bei 4°C mittels eines Beckman JS-13-Ausschwingrotors zentrifugiert. Der Überstand wurde entfernt und das Pellet aus Nuclei in TMS/PMSF/Spermidinphosphat-Puffer resuspendiert, danach erneut 5 Minuten bei 7500 UpM (8950 × g) bei 4°C mittels eines Beckman JI-D-13-Ausschwingrotors zentrifugiert.

Der Überstand wurde entfernt und das Pellet aus Nuclei in einem Puffer resuspendiert, der 50 mM Tris-Acetat, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 10% Glycerin, 0,1% NP-40, 0,4 M KGlu, 0,5 mM PMSF, pH-Wert 7,5 enthielt, wobei ein Puffervolumen von 0,5 ml pro 10 g geernteter Zellen verwendet wurde. Die resuspendierten Nuclei wurden danach in einem «dounced»-Glashomogenisator mit etwa 50 Auf- und Abbewegungen homogenisiert und danach 25 Minuten mit 14 000 UpM bei 4°C in einer Eppendorf-Zentrifuge zentrifugiert. Der den nucleären Extrakt enthaltene Überstand wurde gesammelt, in flüssigem Stickstoff eingefroren und bis zu seiner Verwendung bei -80°C aufbewahrt.

## D. Reinigung von Telomerase

In diesem Beispiel wurden wie in Teil C beschrieben, präparierte nucleäre Extrakte zur Reinigung von *E. aediculatus*-Telomerase verwendet. Bei diesem Reinigungsprotokoll wurde Telomerase zuerst durch Chromatographie auf einer Affi-Gel-Heparinsäule angereichert und danach ausgiebig durch Affinitätsreinigung mit einem «antisense»-Oligonucleotid gereinigt. Da der Matrizenbereich von Telomerase-RNA in dem Telomerase RNP-Partikel einer Hybridisierung zugänglich ist, wurde ein «antisense»-Oligonucleotid (d.h. das «Affinitätsoligonucleotid») als ein «Affinitätsköder» für die Telomerase synthetisiert, wobei dieses Oligonucleotid zu diesem Matrizenbereich komplementär war. Ein Biotinrest wurde an das 5'-Ende des Oligonucleotids angefügt, damit dieses an einer Avidinsäule immobilisiert werden konnte.

Nach der Bindung der Telomerase an das Oligonucleotid und gründlichem Waschen wurde die Telomerase mittels eines Verdrängungsoligonucleotids eluiert. Das Affinitätsoligonucleotid enthielt DNA-Basen, die zu der 5' zu der Telomerase-spezifischen Sequenz gelegenen Telomerase-RNA nicht komplementär war. Da das Verdrängungs-Oligonucleotid zu dem Affinitäts-Oligonucleotid über seine gesamte Länge komplementär war, konnte es eine thermodynamisch stabilere Duplex bilden als die Telomerase, die an das Affinitäts-Oligonucleotid gebunden war. Somit führte die Zugabe des Verdrängungs-Oligonucleotids zu der Elution der Telomerase von der Säule.

In diesem Beispiel wurden aus 45 Liter-Kulturen präparierte nucleäre Extrakt gefroren, bis eine Gesamtmenge von 34 ml an nucleärem Extrakt gewonnen werden konnte. Dies entsprach 630 Liter Kultur (etwa  $4 \times 10^9$  Zellen). Der nucleäre Extrakt wurde mit einem Puffer auf 410 ml verdünnt, wobei Endkonzentrationen von 20 mM Tris-Acetat, 1 mM  $MgCl_2$ , 0,1 mM EDTA, 33 mM KGLu, 10% (Vol./Vol.) Glycerin, 1 mM Dithiothreitol (DTT) und 0,5 mM Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF) bei einem pH-Wert von 7,5 erhalten wurden.

Der verdünnte nucleäre Extrakt wurde auf eine Affi-Gel-Heparin-Gelsäule (Bio-Rad) mit einem Endvolumen von 230 ml und einem Durchmesser von 5 cm gegeben, mit dem gleichen Puffer äquilibriert und mit einem 2 Liter-Gradienten von 33 bis 450 mM KGLu eluiert. Die Säule wurde mit einer Fließgeschwindigkeit von einem Säulenvolumen/Stunde bei 4°C betrieben. Fraktionen von jeweils 50 ml wurden gesammelt und nach einer Telomerase-Aktivität wie in Teil D beschrieben, untersucht.

Telomerase eluierte von der Säule bei etwa 170 mM KGLu. Telomerase enthaltende Fraktionen (etwa 440 ml) wurden vereinigt und eingestellt auf 20 mM Tris-Acetat, 10 mM  $MgCl_2$ , 1 mM EDTA, 300 mM KGLu, 10% Glycerin, 1 mM DTT und 1% Nonidet P-40. Dieser Puffer wurde mit «WB» bezeichnet.

Zu dieser Präparation wurden jeweils 1,5 mMol der zwei kompetitorischen DNA-Oligonucleotide (5'-TAGACCTGTTAGTGTACATTTGAATTGAAGC-3') und (5'-TAGACCTGTTAGGTTGGATTTGTGGCATCA-3'), 50 µg Hefe-RNA (Sigma) und 0,3 nMol Biotin-markiertes Telomerase-spezifisches Oligonucleotid (5'-Biotin-TAGACCTGTTTA-(rmeG)<sub>2</sub>-(rmeU)<sub>4</sub>-(rmeG)<sub>4</sub>-rmeG-3') pro ml des Pools gegeben. Die 2-O-Methylribonucleotide der Telomerase-spezifischen Oligonucleotide waren zu dem Matrizenbereich der Telomerase-RNA komplementär; die Desoxyribonucleotide waren nicht komplementär. Der Einschluss von kompetitorischen, nicht-spezifischen DNA-Oligonucleotiden erhöhte die Wirksamkeit der Reinigung, da die Auswirkungen von Nucleinsäure-bindenden Proteinen und anderen Bestandteilen in dem Gemisch, die entweder an das Affinitätsnucleotid binden oder die Telomerase aus dem Gemisch entfernen würden, minimiert wurden.

Dieses Material wurde dann zu einem «Ultralink»-immobilisierten «Neutravidin plus» (Pierce)-Säulenmaterial bei einem Volumen von 60 µl Suspension pro ml Pool gegeben. Das Säulenmaterial wurde zweimal jeweils 15 Minuten vorblockiert, wobei eine Präparation von WB verwendet wurde, die 0,01% Nonidet P-40, 0,5 mg BSA, 0,5 mg/ml Lysozym, 0,05 mg/ml Glycogen und 0,1 mg/ml Hefe-RNA enthielt. Die Blockierung wurde mittels einer sich drehenden Scheibe durchgeführt, um so das Säulenmaterial gründlich zu blockieren. Nach dem ersten und vor dem zweiten Blockierungsschritt wurde das Säulenmaterial 2 Minuten bei  $200 \times g$  zur Pelletierung der Matrix zentrifugiert.

Das Gemisch aus Pool und Säule wurde auf einer rotierenden Scheibe (etwa 10 UpM; Labindustries) 8 Minuten bei 30°C und im Anschluss daran nochmals 2 Stunden bei 4°C inkubiert, um so die Bindung zu erlauben. Das Gemisch aus Pool und Säule wurde dann 2 Minuten bei  $200 \times g$  zentrifugiert und der ungebundenes Material enthaltende Überstand wurde entfernt. Das Gemisch aus Pool und Säule wurde danach gewaschen. Dieser Waschprozess umfasste folgende Schritte: Spülen des Gemischs aus Pool und Säule bei 4°C mit WB, 15 Minuten Waschen des Gemisches bei 4°C mit WB, Spülen mit WB, 5 Minuten Waschen bei 30°C mit 0,6 M KGLu und kein Nonidet P-40 enthaltendem WB, 5 Minuten Waschen bei 25°C mit WB und zuletzt wiederum Spülen mit WB. Das nach dem letzten Waschschrift verbleibende Volumen wurde gering gehalten, um so ein Verhältnis von Puffer zu Säulenmaterial von etwa 1:1 zu erreichen.

Telomerase wurde von dem Säulenmaterial durch Zugabe von 1 nMol Verdrängungs-Oligonucleotid (5'-CA<sub>4</sub>C<sub>4</sub>A<sub>4</sub>C<sub>2</sub>TA<sub>2</sub>CAG<sub>2</sub>TCTA-3'), pro ml Säulenmaterial und 30 Minuten Inkubation bei 25°C inkubiert. Das Material wurde 2 Minuten bei 14 000 UpM in einer Mikrozentrifuge (Eppendorf) zentrifugiert und das Eluat gesammelt. Die Elutionsprozedur wurde noch zweimal wiederholt, wobei jeweils frisches Verdrängungs-Oligonucleotid verwendet wurde. Wie bereits vorstehend angemerkt, formte das Verdrän-

gungsoligonucleotid mit dem Affinitätsoligonucleotid einen thermodynamisch stabileren Komplex im Vergleich zu Telomerase, da es zu dem Affinitäts-Oligonucleotid komplementär war. Somit wurde durch die Zugabe des V rdrängungs-Oligonucleotids zu einer Affinitäts-gebundenen Telomerase eine wirksame Elution von Telomerase unter nativen Bedingungen erzielt. In diesem Stadium schien die Polymerase etwa 50% rein zu sein, dies wurde anhand einer Analyse auf einem Proteingel bestimmt. Die Affinitäts-Reinigung von Telomerase und Elution mit einem Verdrängungs-Oligonucleotid ist in Fig. 26 (Spur A bzw. B) gezeigt. In dieser Fig. werden die 2'-O-Methylzucker des Affinitäts-Oligonucleotids durch die dicke Linie angezeigt. Die schwarzen und schattierten ovalen Formen sollen in dieser Figur graphisch die erfindungsgemässen Protein-Untereinheiten darstellen.

Die Proteinkonzentrationen des Extrakts und des nach Affi-Gel-Heparin-Säulenchromatographie erhaltenen Materials wurde mittels des Verfahrens von Bradford bestimmt (Bradford, Anal. Biochem. 72 (1976), 248), wobei für die Standards BSA verwendet wurde. Lediglich eine Fraktion der Telomerase-Präparation wurde auf einem Glyceringradienten weiter gereinigt.

Der Sedimentationskoeffizient von Telomerase wurde durch Glycerin-Gradientenzentrifugation, wie in Teil I beschrieben, bestimmt.

Tabelle 5 stellt eine Telomerase bezüglich einer Reinigung für Telomerase dar, die gemäss den Verfahren dieses Beispiels gereinigt wurde. Die Telomerase war im Vergleich zu den Gesamtzellextrakten in nucleären Extrakten 12fach angereichert, wobei eine Ausbeute von 80% erzielt wurde; 85% der Telomerase wurden nach Extraktion aus Nuclei solubilisiert.

Tabelle 5  
Reinigung von Telomerase

Fraktion	Protein (mg)	Telomerase (pMol RNP)	Telomerase/ Protein/pMol RNP/mg	Ausbeute (%)	Reinigungsfaktor
nucleärer Extrakt	2020	1720	0,9	100	1
Heparin	125	1040	8,3	60	10
Affinität	0,3**	680	2270	40	2670
Glyceringradient	NA*	NA*	NA*	25	NA*

\* NA = Nicht verfügbar

\*\* Dieser Wert wurde aus der gemessenen Menge an Telomerase (680 pMol) berechnet, bei einer angenommenen Reinheit von 50% (basierend auf einem Proteingel).

#### E. Telomerase-Aktivität

Bei jedem Schritt bei der Reinigung von Telomerase wurde die Präparation mittels drei getrennter Assays analysiert, einer dieser Assays beruhte auf der Bestimmung der Aktivität, wie in diesem Beispiel beschrieben. Im allgemeinen wurden Telomerase-Assays in einem Volumen von 40 µl ausgeführt, das 0,003 bis 0,3 µl nucleären Extrakt, 50 mM Tris-Cl (pH-Wert 7,5), 50 mM KGlu, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM DTT, 125 µM dTTP, 125 µM dGTP und etwa 0,2 pMol 5'-<sup>32</sup>P-markiertes Oligonucleotidsubstrat (d.h. etwa 400 000 cpm) enthielt. Oligonucleotidprimer wurden vor der Zugabe zum Reaktionsgemisch hitzedenaturiert. Die Reaktionen wurden auf Eis zusammengestellt und 30 Minuten bei 25°C inkubiert. Die Reaktionen wurden durch Zugabe von 200 µl 10 mM Tris-Cl (pH-Wert 7,5), 15 mM EDTA, 0,6% SDS und 0,05 mg/ml Proteinase K gestoppt und mindestens 30 Minuten bei 45°C inkubiert. Nach Ethanolpräzipitation wurden die Produkte auf denaturierenden 8%ige PAGE-Gelen analysiert, wie dies auf dem Fachgebiet bekannt ist (siehe z.B. Sambrook et al., 1989).

#### F. Quantifizierung von Telomerase-Aktivität

In diesem Beispiel wird die Quantifizierung von Telomerase-Aktivität während der Reinigungsprozedur beschrieben. Die Quantifizierung wurde durch Untersuchung der Verlängerung von Oligonucleotidprimern in Gegenwart von dGTP und [α-<sup>32</sup>P]dTTP erreicht.

Kurz zusammengefasst: 1 µM 5'-(G<sub>4</sub>T<sub>4</sub>)<sub>2</sub>-3'-Oligonucleotid wurde in einem 20 µl-Reaktionsgemisch in Gegenwart von 2 µl [α-<sup>32</sup>P]dTTP (10 mCi/ml, 400 Ci/mMol; 1 Ci = 37 GBq) und 125 µM dGTP wie in Lingner et al., (Genes Develop. 8 (1994), 1984) beschrieben verlängert und auf ein 80%ige PAGE-Sequenzierungsgel, so wie dies auf dem Fachgebiet bekannt ist, aufgetragen (siehe z.B. Sambrook et al., 1989).

Die Ergebnisse dieser Untersuchung sind in Fig. 28 gezeigt. In Spur 1 ist keine Telomerase vorhanden (d.h. negative Kontrolle), die Spuren 2, 5, 8 und 11 enthielten 0,14 fMol Telomerase; die Spuren 3, 6, 9 und 12 enthielten 0,42 fMol Telomerase und die Spuren 4, 7, 10 und 13 enthielten 1,3 fMol Telomeras. Die Aktivität wurde mittels eines «Phosphorlmager» (Molecular Dynamics) gemäss den Anwei-



sungen des Herstellers quantifiziert. Die Messung ergab, dass unter diesen Bedingungen 1 fMol affinitäts-gereinigte Telomerase 21 fMol dTTP in 30 Minuten einbaute.

Wie in dieser Figur gezeigt, änderte sich die spezifische Aktivität der Telomerase nicht wesentlich während der Reinigungsprozedur. Affinitäts-gereinigte Telomerase war vollständig aktiv. Bei hohen Konzentrationen konnte jedoch eine inhibitorische Aktivität nachgewiesen werden und die Aktivität der Roh-extrakte war nicht linear. Daher wurde in d m in Fig. 28 gezeigten Assay der hohe Extrakt 700–7000fach verdünnt. Durch die Reinigung wurde die inhibitorische Aktivität entfernt und es wurde selbst bei hohen Enzymkonzentrationen keine inhibitorische Wirkung in den Präparationen von gereinigter Te-lomerase nachgewiesen.

#### G. Gelelektrophorese und Northern-Blots

Wie in Teil E angegeben, wurde bei jedem Reinigungsschritt für Telomerase die Präparation mittels dreier getrennter Assays analysiert. In diesem Beispiel werden Gelelektrophorese-Prozeduren und Blot-ting-Prozeduren beschrieben, die zur Quantifizierung von in Fraktionen enthaltener Telomerase-RNA und zur Analyse der Integrität des Telomerase-Ribonucleoprotein-Partikels verwendet wurden.

##### i) Denaturierende Gele und Northern-Blots

In diesem Beispiel diente eine synthetische T7-transkribierte Telomerase-RNA mit bekannter Konzen-tration als Standard. Während dieser Untersuchung wurde der RNA-Bestandteil als ein Mass für Telo-merase verwendet.

Es wurde mittels der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) ein Konstrukt für die Transkription von E. aediculatus-Telomerase-RNA durch die T7-Phagen-RNA-Polymerase hergestellt. Das Telomerase-RNA-Gen wurde mit Primern amplifiziert, die sich an die beiden Enden des Gens anlagerten. Die Primer, die sich an das 5'-Ende anlagerten, codierten auch eine «hammerhead»-Ribozymsequenz, um so das na-türliche 5'-Ende nach Spaltung der transkribierten RNA zu erzeugen, eine T7-Promotorsequenz und eine EcoRI-Stelle für die Subclonierung.

Die Sequenz dieses 5'-Primers war 5'-

```
CGCGGAATTCTAATACGACTCACTATAGGGAAGAACTCTGATGAGGCCGA
AAGGCCGAAACTCCACGAAAGTGGAGTAAGTTTCTCGATAATTGATCTGTA
```

G-3'. Der 3'-Primer enthielt eine Earl-Stelle für die Termination der Transkription an dem natürlichen 3'-Ende und eine BamHI-Stelle für die Clonierung. Die Sequenz dieses 3'-Primers war 5'-CGGGGATCC-TCTTCAAAGATGAGAGGACAGCAAAC-3'. Das PCR-Amplifikationsprodukt wurde mit EcoRI und BamHI gespalten und in die entsprechenden Stellen von pUC19 (NEB) subcloniert, wobei «pEaT7» er-halten wurde. Durch DNA-Sequenzierung wurde die korrekte Insertion bestätigt. T7-Transkription wurde wie von Zaug et al., Biochemistry 33 (1994) 14935 beschrieben mit einem Earl-linearisierten Plasmid durchgeführt. Die RNA wurde gelgereinigt und die Konzentration bestimmt (bei A<sub>260</sub> von 1 = 40 µg/ml). Die RNA wurde als Standard zur Bestimmung der in verschiedenen Präparationen von Telomerase vor-handenen Telomerase-RNA als Standard verwendet.

Das Hybridisierungssignal war proportional zu der Menge an Telomerase-RNA und die abgeleiteten RNA-Konzentrationen stimmten mit den durch native Gelelektrophorese erhaltenen Konzentrationen im Prinzip überein, waren jedoch leicht höher. Der Vergleich der Menge an gesamter Telomerase-RNA in Gesamt-Zell-RNA mit seriellen Verdünnungen von bekannten T7-RNA-Transkriptkonzentrationen zeigte an, dass jede E. aediculatus-Zelle etwa 300 000 Telomerase-Moleküle enthielt.

Die Sichtbarmachung der Telomerase wurde durch Northern-Blot-Hybridisierung an deren RNA-Be-standteil erzielt, wobei die von Lingner et al. beschriebenen Verfahren verwendet wurden (Lingner et al., Genes Develop. 8 (1994), 1984). Kurz zusammengefasst: RNA (0,5 µg/Spur oder weniger) wurde durch 8%ige PAGE aufgetrennt und auf eine «Hybond-N»-Membran (Amersham), wie dies auf dem Fachge-biet bekannt ist, elektrogeblottet (siehe z.B. Sambrook et al. 1989). Der Blot wurde in 10 ml 4 × SSC, 10 × Denhardt-Lösung, 0,1% SDS und 50 µl/ml denaturierte Heringssperma-DNA über Nacht hybridisiert. Nach 3 Stunden Vorhybridisierung wurden 2 × 10<sup>6</sup> cpm-Sonde/ml Hybridisierungslösung zugegeben. Die zufallsmarkierte Sonde war ein PCR-Produkt, das das gesamte Telomerase-RNA-Gen bedeckte. Der Blot wurde bei verschiedenen Pufferaustauschen 30 Minuten 2 × SSC, 0,1% SDS und danach 1 Stunde in 0,1 × SSC und 0,1% SDS bei 45°C gewaschen.

##### ii) Native Gele und Northern-Blots

In diesem Experiment wurde die Präparation an gereinigter Polymerase auf nativen (d.h. nicht-dena-turierenden) Gelen aus 3,5% Polyacrylamid und 0,33% Agarose aufgetrennt, wie dies auf dem Fachge-biet bekannt und von Lamond und Sproat beschrieben ist (Lamond and Sproat (1994), a.a.O.). Die Telo-merase comigriert etwa mit dem Farbstoff Xylencyanol.

Die Ergebnisse mit nativen Gelen zeigten an, dass während des Reinigungsverfahrens Telomerase als RNP beibehalten wurde. Fig. 27 ist ein Foto eines Northern-Blots, das die Mobilität der Telomerase in verschiedenen Fraktionen auf einem nicht-denaturierenden Gel zeigt, sowie die Mobilität von in vitro-transkribierter Telomerase. Spur 1 in dieser Figur enthielt 1,5 fMol Telomerase-RNA, Spur 2 4,6 fMol Telomerase-RNA, Spur 3 14 fMol Telomerase-RNA, Spur 4 41 fMol-Telomerase-RNA, Spur 5 nucleären Extrakt (42 fMol Telomerase), Spur 6 Affi-Gel-Heparin-gereinigte Telomerase (47 fMol Telomerase), Spur 7 affinitätsgereinigte Telomerase (68 fMol) und Spur 8 über einen Glycerolgradienten gereinigte Telomerase (35 fMol).

Wie in Fig. 27 gezeigt, war in nucleären Extrakten die Telomerase zu einem RNP-Partikel assembliert, der langsamer wanderte als nicht-assemblierte Telomerase-RNA. Durch dieses Verfahren wurde weniger als 1% freie RNA nachgewiesen. Es konnte jedoch in Extrakten gelegentlich auch ein langsamer wandernder Telomerase-RNP-Komplex nachgewiesen werden. Nach Reinigung auf der Affi-Gel-Heparinsäule wies der Telomerase-RNP-Partikel keine Veränderung in der Mobilität auf (Fig. 27, Spur 6). Nach Affinitätsreinigung war jedoch die Mobilität des RNA-Partikels leicht erhöht (Fig. 27, Spur 7), was vielleicht anzeigt, dass eine Protein-Untereinheit oder ein -Fragment verloren ging. Auf Glyceringradienten veränderte die affinitätsgereinigte Telomerase ihre Grösse nicht, es waren jedoch etwa 2% freie Telomerase-RNA nachweisbar (Fig. 27, Spur 8), was nahelegt, dass eine geringe Disassemblierung des RNP-Partikels eingetreten war.

#### G. Telomerase-Protein-Zusammensetzung

In diesem Beispiel ist die Analyse der gereinigten Telomerase-Protein-Zusammensetzung beschrieben.

In diesem Beispiel wurden die in Teil D erhaltenen Glyceringradienten-Fractionen auf einem 4 bis 20%igen Polyacrylamidgel (Novex) aufgetrennt. Nach der Elektrophorese wurde das Gel mit Coomassie-Brilliant-Blau angefärbt. Fig. 29 zeigt ein Photo dieses Gels. Die Spuren 1 und 2 enthielten Molekulargewichtsmarker (Pharmacia) wie dies auf der linken Seite des in Fig. 29 gezeigten Gels angezeigt ist. Die Spuren 3 bis 5 enthielten vereinigte Glycerin-Gradientenfraktionen, wie dies oberhalb des Gels angezeigt ist (d.h. Spur 3 enthielt Fraktionen 9-14, Spur 4 Fraktionen 15-22 und Spur 5 Fraktionen 23-32). Spur 4 enthielt den Pool mit 1 pMol Telomerase-RNA. In den Spuren 6 bis 9 waren BSA-Standards mit den oberhalb des Gels in Fig. 29 angezeigten Konzentrationen laufen gelassen (d.h. Spur 6 enthielt 0,5 pMol BSA, Spur 7 1,5 pMol BSA, Spur 8 4,5 pMol BSA und Spur 9 15 pMol BSA).

Wie in Fig. 29 gezeigt ist, wurden Polypeptide mit einem Molekulargewicht von 120 und 43 kD zusammen mit der Telomerase aufgereinigt. Das 43 kD-Polypeptid trat als eine Dublette auf. Es wurde festgestellt, dass das Polypeptid mit etwa 43 kD in Spur 3 anders wanderte als die Dublette in Spur 4, es könnte sich dabei um ein nicht-verwandtes Protein handeln. Das 120 kD-Protein und die 43 kD-Dublette zeigen beide nach Anfärbung mit «Coomassie-Brilliant-Blau» einen Spiegel von etwa 1 pMol im Vergleich zu BSA-Standards. Da diese Fraktion 1 pMol Telomerase-RNA enthielt, die vollständig zu einem RNP-Partikel assembliert war (siehe Fig. 27, Spur 8), scheint es zwei Polypeptid-Untereinheiten zu geben, die zu der Telomerase-RNA stöchiometrisch sind. Es kann jedoch auch möglich sein, dass die zwei Proteine um 43 kD getrennte Enzym-Untereinheiten sind.

Affinitätsgereinigte Telomerase, die nicht einer Fraktionierung auf einem Glyceringradienten unterworfen wurde, enthielt zusätzliche Polypeptide mit einem geschätzten Molekulargewicht von 35 bzw. 37 kD. Es wurde geschätzt, dass diese letztere Fraktion zu mindestens 50% rein ist. Die hier in dem affinitäts-gereinigten Material vorhandenen 35 kD- und 37 kD-Polypeptide wurden jedoch durch Glyceringradienten-Zentrifugation nicht reproduzierbar aufgetrennt. Diese Polypeptide können Verunreinigungen darstellen, da sie nicht in allen Aktivitäts-enthaltenden Präparationen sichtbar waren.

#### H. Sedimentationskoeffizient

Der Sedimentationskoeffizient für Telomerase wurde durch Glyceringradienten-Zentrifugation bestimmt. In diesem Beispiel wurden nucleärer Extrakt und affinitäts-gereinigte Telomerase auf 15-40%igen Glyceringradienten fraktioniert, die 20 mM Tris-Acetat, 1 mM  $MgCl_2$ , 0,1 mM EDTA, 300 mM KGlu und 1 mM DTT, pH-Wert 7,5, enthielten. Glyceringradienten wurden in 5 ml-Röhrchen (13 x 51 mm) gegeben und mittels eines SW55Ti-Rotors (Beckman) 14 Stunden mit 55 000 UpM bei 4°C zentrifugiert.

In einem parallelen Gradienten wurden Marker-Proteine laufen gelassen; es ergab sich ein Sedimentationskoeffizient von 7,6 S für Alkoholdehydrogenase (ADH) 113 S für Katalase, 17,3 S für Apoferritin und 19,3 S für Thyroglobulin. Der Telomerase-Peak wurde durch Elektrophorese von Gradientenfraktionen auf einem nativen Gel und im Anschluss daran Blot-Hybridisierung an deren RNA-Komponente identifiziert.

Fig. 30 ist eine graphische Darstellung, die den Sedimentationskoeffizienten für Telomerase zeigt. Wie in dieser Figur gezeigt ist, co-sedimentierte affinitäts-gereinigte Telomerase mit Katalase bei 11,5 S, während Telomerase aus nucleären Extrakten etwas schneller sedimentierte mit dem Peak um 12,5 S. Somit scheint gereinigte Telomerase ein proteolytisches Fragment oder eine lose assoziierte Untereinheit verloren zu haben, was mit der Mobilität des Enzyms in nativen Gelen übereinstimmt.

Das geschätzte Molekulargewicht für T lomerase ergibt einen Gesamtw rt von insgesamt 229 kD, wenn man davon ausgeht, dass sie aus einer Protein-Untereinheit mit 120 kD, einer Protein-Untereinheit mit 43 kD und einer RNA-Untereinheit mit 66 kD besteht. Dies ist in enger Übereinstimmung mit dem Molekulargewicht von 232 kD von Katalase. Der Sedimentationskoeffizient ist jedoch nicht nur eine Funktion des Molekularg wichts sondern auch des spezifisch n Teilvolumens und des Reibungskoeffizienten des Moleküls, wobei beide Parameter für das Telomerase-RNP nicht bekannt sind.

#### 1. Substratverwertung

In diesem Beispiel wurden die Erfordernisse von Telomerase hinsichtlich des Substrats untersucht. Ein einfaches Modell für die Replikation von DNA-Enden geht von der Annahme aus, dass nach semi-konservativer DNA-Replikation Telomerase doppelsträngige, mit glatten Enden versehene DNA-Moleküle verlängert. Bei einer Variation dieses Modells wird davon ausgegangen, dass ein einzelsträngiges 3'-Ende durch eine Helicase oder Nuclease nach Replikation erzeugt wird. Dieses 3'-Ende wird dann von der Telomerase für die Bindung und Verlängerung verwendet.

Um zu bestimmen, ob Telomerase mit glatten Enden versehene Moleküle verlängern kann, wurden Modell-Haarnadelstrukturen mit an deren 3'-Enden gelegenen Telomer-Wiederholungseinheiten synthetisiert. Diese Primersubstrate wurden gelgereinigt, mit Polynucleotidkinase 5'-endmarkiert, 5 Minuten bei 80°C und bei 0,4 µM erhitzt und dann in einem Hitzeblock langsam auf Raumtemperatur abgekühlt, um so eine Renaturierung und Helixbildung der Haarnadelstrukturen zu erlauben. Die Substratmobilität auf einem nicht-denaturierenden Gel zeigte, dass im Vergleich zur Dimerisierung eine sehr effiziente Haarnadelbildung vorhanden war.

In diesem Beispiel wurden Assays durchgeführt mit unmarkiertem 125 µM dGTP, 125 µM dTTP und 0,02 µM 5'-endmarkierten Primer (5'-<sup>32</sup>P-markiertem Oligonucleotid-Substrat) in 10 µl Reaktionsgemischen, die 20 mM Tris-Acetat enthielten mit 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 50 mM KGlu und 1 mM DTT bei einem pH-Wert von 7,5. Diese Gemische wurden 30 Minuten bei 25°C inkubiert. Die Reaktionen wurden durch Zugabe von Formamid-Auftragspuffer gestoppt (d.h. TBE, Formamid, Bromthymol-Blau und -Cyanol, Sambrook, 1989, a.a.O.).

Primer wurden ohne Telomerase inkubiert ("—"), mit 5,9 fMol affinitätsgereinigter Telomerase ("++"), oder mit 17,6 fMol affinitätsgereinigter Telomerase ("+++"). Die in diesem Assay verwendete affinitätsgereinigte Telomerase wurde mit einer Membran mit einer molekularen Ausschlussgrenze von 100 kD dialysiert, um so das Verdrängungsoligonucleotid zu entfernen. Die Reaktionsprodukte wurden auf einem 8%igen PAGE (Harnstoffgel, das zur Denaturierung der Haarnadelstruktur 36% Formamid enthielt) aufgetrennt. Die Sequenzen der in dieser Untersuchung verwendeten Primer sowie ihre Spurzuordnungen sind in Tabelle 6 gezeigt.

Tabelle 6

## Primersequenzen

Spur	Primersequenz (5' nach 3')
1-3	$C_4(A_4C_4)_3CACA(G_4T_4)_3G_4$
4-6	$C_2(A_4C_4)_3CACA(G_4T_4)_3G_4$
7-9	$(A_4C_4)_3CACA(G_4T_4)_3G_4$
10-12	$A_2C_4(A_4C_4)_2CACA(G_4T_4)_3G_4$
13-15	$C_4(A_4C_4)_2CACA(G_4T_4)_3$
16-18	$(A_4C_4)_3CACA(G_4T_4)_3$
19-21	$A_2C_4(A_4C_4)_2CACA(G_4T_4)_3$
22-24	$C_4(A_4C_4)_2CACA(G_4T_4)_3$
25-27	$C_2(A_4C_4)_2CACA(G_4T_4)_3$
28-30	$(A_4C_4)_2CACA(G_4T_4)_3$

Die mit den Gelen erhaltenen Ergebnisse sind in Fig. 31 gezeigt. Die Spuren 1–15 enthielten Substrate mit Telomer-Wiederholungseinheiten, die mit vier G-Resten endeten. Die Spuren 16–30 enthielten Substrate mit Telomer-Wiederholungseinheiten, die mit vier T-Resten endeten. Die mutmassliche Ausrichtung auf der Telomerase-RNA-Matrize ist in Fig. 32 angegeben. Es wird angenommen, dass die Primersätze sich an zwei verschiedenen Positionen in der in Fig. 32 gezeigten Matrize (d.h. 32A bzw. 32B). Dies könnte ihre Bindungs- und/oder Verlängerungsrate beeinflusst haben.

Fig. 33 zeigt eine geringere Belichtung der Spuren 25–30 von Fig. 31. Die geringere Belichtung von Fig. 33 wurde deshalb durchgeführt, um die Sichtbarmachung der Nucleotide zu erlauben, die zugegeben wurden, und der Verzögerungspositionen in verlängertem Produkten. Der Prozentsatz an verlängertem Substrat wurde für jede dritte Linie eines Satzes auf einem «Phosphorimager», wie dies in der Fig. 31 unten gezeigt ist, quantifiziert.

Die Wirksamkeit dieser Haarnadelstrukturen als Substrat wurde mit doppelsträngigen Telomer-ähnlichen Strukturen mit Überhängen unterschiedlicher Länge verglichen. Ein Modellsubstrat, das mit vier G-Resten endete (siehe die Spuren 1 bis 15 von Fig. 31), wurde dann nicht verlängert, wenn es ein glattes Ende enthielt (siehe Spuren 1–3). Es wurde jedoch eine leichte Verlängerung mit einer Überhanglänge von zwei Basen beobachtet. Die Verlängerung wurde jedoch effizient, wenn der Überhang etwa 4 Basen lang war. Die Telomerase wirkte auf ähnliche Weise mit einem doppelsträngigen Substrat, das mit vier T-Resten endete, wobei ein Überhang von 6 Basen für eine hocheffiziente Verlängerung erforderlich war. Die schwachen Banden unter den Primern in den Spuren 10–15 von Fig. 31, die unabhängig von Telomerase sind, stellen kürzere Oligonucleotide in den Primerpräparationen dar.

Durch die schwächere Belichtung der Spuren 25–30 in Fig. 33 zeigt sich eine Leiter von verlängerten Produkten, wobei die dunkelsten Banden mit der vermutlichen 5'-Grenze der Matrize korrelieren (wie von Lingner et al., Genes Develop. 8 (1994), 1984 beschrieben). Das häufige Auftreten von Produkten, die anderen Positionen in der Matrize entsprechen, legte nahe, dass ein «Innehalten» und/oder eine «Dissoziation» mit der gereinigten Polymerase an Stellen vorkommt, die nicht der Translokationsstelle entsprechen.

Wie in Fig. 31 gezeigt, waren doppelsträngige, mit glatten Enden versehene Oligonucleotide keine Substrate für Telomerase. Um herauszufinden, ob diese Moleküle an Telomerase binden können, wurde ein Konkurrenzexperiment durchgeführt. In diesem Experiment wurden 2 nM 5'-endmarkiertes Substrat mit der Sequenz  $(G_4T_4)_2$  bzw. ein Haarnadelsubstrat mit einem Überhang von sechs Basen mit 0,125 mM Telomerase verlängert (Fig. 31, Spuren 25–27). Obwohl die gleichen unmarkierten Oligonucleotid-

substrate effizient mit dem markierten Substrat bezüglich der Verlängerung konkurrierten, wurde keine Herabsetzung an Aktivität beobachtet, wenn die doppelsträngigen, mit glatten Enden versehenen Haarnadel-Oligonucleotide als Kompetitoren verwendet wurden, selbst in Gegenwart eines 100fachen Überschusses von Haarnadelstrukturen.

- 5 Diese Ergebnisse zeigten an, dass doppelsträngige, mit glatten Enden versehene Oligonucleotide bei dem in diesem Beispiel getesteten Konzentrationen Telomerase nicht binden können, d.h. ein einzelsträngiges 3'-Ende ist für eine Bindung erforderlich. Wahrscheinlich wird dieses 3'-Ende für eine Basenpaarung mit der Telomerase-RNA-Matrize benötigt.

#### 10 J. Clonierung & Sequenzierung des 123 kD-Polypeptids

In diesem Beispiel wird die Clonierung des 123 kD-Polypeptids von Telomerase, (d.h. die 123 kD-Protein-Untereinheit) beschrieben. In dieser Untersuchung wurde ein internes Fragment des Telomerasegens mittels PCR amplifiziert. Es wurden Oligonucleotid-Primer verwendet, die so konstruiert waren, dass sie mit den von dem im vorstehenden Teil D erhaltenen gereinigten Polypeptid erhaltenen Peptidsequenzen übereinstimmen. Die Polypeptidsequenz wurde mittels des «nanoES-Tandem»-Massenspektroskopieverfahrens bestimmt, das auf dem Fachgebiet bekannt und von Calvio et al., RNA 1 (1995), 724-733 beschrieben ist. Die in diesem Beispiel verwendeten Oligonucleotidprimer hatten die folgenden Sequenzen, wobei degenerierte Positionen in Klammern gezeigt sind:

5' - TCT(G/A)AA(G/A)TA(G/A)TG(T/G/A)GT(G/A/T/C)A(T/G/A)(G/A)TT(G/A)TTCA  
t-3' und

5'- GCGGATCCATGAA(T/C)CC(A/T)GA(G/A)AA(T/C)CC(A/T)AA(T/C)GT-3'

Eine 50 µl-Reaktion enthielt 0,2 mM dNTPs, 0,15 µg E. aediculatus chromosomale DNA, 0,5 µl Taq (Boehringer Mannheim), jeweils 0,8 µg Primer und 1 × Reaktionspuffer (Boehringer Mannheim). Die Reaktion wurde in einem «Thermocycler» (Perkin-Elmer) inkubiert, wobei 5 Minuten bei 95°C inkubiert wurde, danach folgten 30 Cyclen von jeweils 1 Minute bei 94°C, 1 Minute bei 52°C und 2 Minuten bei 72°C. Die Reaktion wurde durch 10minütige Inkubation bei 72°C vervollständigt.

Eine genomische DNA-Bank wurde aus der chromosomalen DNA von E. aediculatus durch Clonierung von DNA mit glatten Enden in die Smal genannte Stelle des «pCR-Script»-Plasmidvektors (Stratagene) präpariert. Diese Bank wurde durch Koloniehybridisierung mit dem radioaktiv markierten gel-gereinigten PCR-Produkt gescreent. Die Plasmid-DNA von positiven Clonen wurde präpariert und gemäss dem Didesoxy-Verfahren sequenziert (Sanger et al., Proc. Natl. Acad. Sci., 74 (1977), 5463) oder manuell mittels eines automatischen Sequenziergeräts (ABI). Die DNA-Sequenz des Gens, das dieses Polypeptid codiert, ist in Fig. 13 gezeigt. Das von der DNA-Sequenz abgeleitete Startcodon liegt in dieser Sequenz bei dem Nucleotid an der Position 101 und der offene Leserahmen endet an Position 3193. Der genetische Code von Euplotes unterscheidet sich von anderen Organismen dadurch, dass das «UGA»-Codon einen Cystein-Rest codiert. Die von der DNA-Sequenz abgeleitete Aminosäuresequenz des Polypeptids ist in Fig. 14 gezeigt. Dabei wurde angenommen, dass keine ungewöhnlichen Aminosäuren während der Translation eingebaut werden und keine posttranslationalen Modifizierungen vorkommen.

#### 45 K. Clonierung und Sequenzierung des 43 kD-Polypeptids

In diesem Beispiel wird die Clonierung des 43 kD-Polypeptids von Telomerase (d.h. der 43 kD-Protein-Untereinheit) beschrieben. Bei dieser Untersuchung wurde ein internes Fragment des Telomerasegens mittels PCR amplifiziert, wobei Oligonucleotidprimer verwendet wurden, die so entworfen wurden, dass sie zu den Peptidsequenzen passen, die von dem im vorstehenden Teil D erhaltenen gereinigten Polypeptid erhalten wurden. Die Polypeptidsequenz wurde mittels der auf dem Fachgebiet bekannten und von Calvio et al., RNA 1 (1995), 724-733 beschriebenen «nanoES-Tandem»-Massenspektroskopieverfahren bestimmt. Die in diesem Beispiel verwendeten oligonucleotidprimer hatten die folgenden Sequenzen:

5'-NNNGTNAC(C/T/A)GG(C/T/A)AT(C/T/A)AA(C/T)AA-3' und

5'-(T/G/A)GC(T/G/A)GT(C/T)TC(T/C)TG(G/A)TC(G/A)TT(G/A)TA-3'.

In dieser Sequenz bedeutet «N» die Anwesenheit eines von vier Nucleotiden (d.h. A, T, G oder C).

Eine 50 µl-Reaktion enthielt 0,2 mM dNTPs, 0,2 µg E. aediculatus chromosomale DNA, 0,5 µl Taq (Boehringer Mannheim), jeweils 0,8 µg Primer und 1 × Reaktionspuffer (Boehringer Mannheim). Die Reaktion wurde in einem «Thermocycler» (Perkin-Elmer) inkubiert, wobei 5 Minuten bei 95°C inkubiert wurde, danach folgten 30 Cyclen von jeweils 1 Minute bei 94°C, 1 Minute bei 52°C und 1 Minute bei 72°C. Die Reaktion wurde durch 10minütige Inkubation bei 72°C vervollständigt.

Eine genomische DNA-Bank wurde aus der chromosomalen DNA von E. aediculatus durch Clonie-

5 rung von DNA mit glatten Enden in die SmaI genannte Stelle des «pCR-Script»-Plasmidvektors (Stratagene) präpariert. Diese Bank wurde durch Koloniehybridisierung mit den radioaktiv markierten gel-gereinigten PCR-Produkten g screened. Die Plasmid-DNA von positiven Clonen wurde präpariert und gemäss dem Dideoxy-Verfahren sequenziert (Sanger et al., Proc. Natl. Acad. Sci., 74 (1977), 5463) oder manuell mittels eines automatischen Sequenziergeräts (ABI). Die DNA-Sequenz des Gens, das dieses Polypeptid codiert, ist in Fig. 34 gezeigt. Drei mögliche Leserahmen sind für diese Sequenz gezeigt, wie dies in Fig. 35 dargestellt ist. Aus Gründen der Übersichtlichkeit ist die Aminosäuresequenz unter der Nucleotidsequenz für alle drei Leserahmen angegeben. Diese Leserahmen tragen die Bezeichnungen «a», «b» und «c». Ein mögliches Startcodon wird an der Nucleotidposition 84 im Leserahmen «c» codiert. Der codierende Bereich könnte an Position 1501 in Leserahmen «b» enden. Codons für einen vorzeitigen Stop, die in dieser Figur mit Sternchen bezeichnet sind, kommen in allen drei Leserahmen zwischen den Nucleotidpositionen 337–350 vor.

10 Die «La-Domäne» ist durch fette Buchstaben gekennzeichnet. Weiter stromabwärts scheint die Proteinsequenz durch unterschiedliche Leserahmen codiert zu sein, da keiner dieser Leserahmen durch Stopcodons unterbrochen ist. Darüber hinaus sind Peptidsequenzen von dem gereinigten Protein in allen drei Leserahmen codiert. Somit scheint dieses Gen Intronsequenzen zu enthalten, oder, alternativ, die RNA wird editiert. Zu weiteren Möglichkeiten zählen ribosomale Leserahmenverschiebung oder Sequenzierungsfehler. Die Homologie zu der Sequenz des La-Proteins bleibt jedoch von grossem Interesse. Es soll nochmals angemerkt werden, dass in Euplotes das «UGA»-Codon einen Cystein-Rest codiert.

#### L. Vergleiche von Aminosäuren und Nucleinsäuren

25 In diesem Beispiel werden Vergleiche zwischen veröffentlichten Sequenzen und den Sequenzen der 123 kD- und 43 kD-Telomerase-Polypeptid-Untereinheiten durchgeführt.

##### i) Vergleiche mit der 123 kD-Telomerase-Untereinheit von *E. aediculatus*

30 Die Aminosäuresequenz des 123 kD-Polypeptids von Euplotes aediculatus wurde mit der Sequenz der 80 kD-Telomerase-Protein-Untereinheit von Tetrahymena thermophila (GenBank-Zugangsnummer #U25641) zur Untersuchung ihrer Ähnlichkeit verglichen. Die dieses Protein codierende Nucleotidsequenz, die von GenBank erhalten wurde ist in Fig. 42 gezeigt. Die Aminosäuresequenz dieses Proteins, so wie es von GenBank erhalten wurde, ist in Fig. 43 gezeigt. Der Sequenzvergleich zwischen dem 123 kD-Protein von E. aediculatus und dem 80 kD-Protein von T. thermophila ist in Fig. 36 gezeigt. In dieser Figur stellt die Sequenz von E. aediculatus die obere Sequenz dar und die Sequenz von T. thermophila die untere Sequenz. In dieser sowie in den Fig. 37–39 sind Identitäten durch vertikale Balken angezeigt, während einzelne Punkte zwischen den Sequenzen Aminosäuren mit etwas Ähnlichkeit anzeigen und Doppelpunkte zwischen den Sequenzen Aminosäuren mit grösserer Ähnlichkeit anzeigen. Die nachgewiesene Identität lag bei etwa 19%, während der Prozentsatz an Ähnlichkeit etwa 45% betrug.

40 Diese Werte ähneln denen, die mit einer beliebigen Zufallsproteinsequenz beobachtet werden. Die Aminosäuresequenz des 123 kD-Polypeptids von Euplotes aediculatus wurde auch mit der Sequenz der 95 kD-Telomerase-Protein-Untereinheit von Tetrahymena thermophila (GenBank-Zugangsnummer #U25642) zur Untersuchung der Ähnlichkeiten verglichen. Die von GenBank erhaltene, dieses Protein codierende Nucleotidsequenz ist in Fig. 44 gezeigt. Die Aminosäuresequenz des von GenBank erhaltenen Proteins ist in Fig. 45 gezeigt, und der Sequenzvergleich in Fig. 37. In dieser Figur ist die Sequenz von E. aediculatus die obere Sequenz und die Sequenz von T. thermophila die untere Sequenz. Identitäten sind durch vertikale Balken angezeigt. Die beobachtete Identität betrug etwa 20%, während der Prozentsatz an Ähnlichkeit etwa 43% betrug. Diese Werte ähneln den Werten, die man mit einer beliebigen Zufallsproteinsequenz beobachtet.

50 Es ist auffallend, dass die Aminosäuresequenz des 123 kD-Proteins von E. aediculatus die fünf Motive enthält, die charakteristisch für reverse Transkriptasen sind. Das 123 kD-Polypeptid wurde auch mit den Polymerase-Domänen von verschiedenen reversen Transkriptasen verglichen. Fig. 40 zeigt die Ausrichtung des 123 kD-Polypeptids mit dem vermutlichen Hefe-Homologen (L8543.12 oder ESTp). Die Aminosäuresequenz von L8543.12 (oder ESTp), die von GenBank erhalten wurde, ist in Fig. 46 gezeigt.

55 Vier Motive (A, B, C und D) waren Bestandteil dieses Vergleichs. In Fig. 40 sind hochkonservierte Reste durch weisse Buchstaben auf schwarzem Hintergrund gekennzeichnet. Reste der Sequenzen von E. aediculatus, die in der anderen Sequenz konserviert sind, sind durch Fettdruck gekennzeichnet. Das «h» bezeichnet das Vorhandensein einer hydrophoben Aminosäure. Die Ziffern zwischen den Aminosäureresten der Motive bezeichnen die Menge von Lücken innerhalb der Sequenzen. Beispielsweise betrifft die «100» zwischen den Motiven A und B eine Lücke von 100 Aminosäuren in der Sequenz zwischen den Motiven.

60 Durch das Absuchen der Genbank konnte ein Hefeprotein (GenBank Zugangsnummer #u20618) und das Gen «L8543.12» (Est2) identifiziert werden, das etwas Homologie zu der 123 kD-Telomerase-Untereinheit von E. aediculatus zeigt. Anhand der Beobachtung, dass beide Proteine reverse Transkriptase-Motive in ihren C-terminalen Bereichen enthalten; dass beiden Proteinen gemeinsam ist, dass sie Ähn-

lichkeit in Berichen ausserhalb des revers Transkriptase-Motivs zeigen; dass die Proteine ähnlich basisch sind (pI = 10,1 für *E. aediculatus* und pI = 10,0 für Hefe); und beide Proteine gross sind (123 kD für *E. aediculatus* und 103 kD für Hefe) kann gefolgert werden, dass diese Sequenzen den katalytischen Kern ihrer entsprechenden Telomerasen umfassen. Aufgrund dieser Beobachtung bezüglich der Homologie zwischen zwei phylogenetisch entfernten Organismen wie *E. aediculatus* und Hefe wird davon ausgegangen, dass menschliche Telomerase ein Protein enthält, das dieselben Merkmale aufweist (d.h. reverse Transkriptase-Motive aufweist, basisch ist und gross (> 100 kD)).

## ii) Vergleiche mit der 43 kD-Telomerase-Untereinheit von *E. aediculatus*

Die Aminosäuresequenz der «La-Domäne» des 43-kD-Polypeptids von *Euplotes aediculatus* wurde mit der Sequenz der 95 kD-Telomerase-Protein-Untereinheit von *Tetrahymena thermophila* (vorstehend beschrieben) zur Untersuchung deren Ähnlichkeit verglichen. Der Sequenzvergleich ist in Fig. 38 gezeigt. In dieser Figur ist die *E. aediculatus*-Sequenz die obere Sequenz und die Sequenz von *T. thermophila* ist die untere Sequenz. Identitäten sind mit vertikalen Balken gekennzeichnet. Die beobachtete Identität betrug etwa 23%, während der Prozentsatz an Ähnlichkeit etwa 46% betrug. Diese Werte ähneln denen, die man mit beliebigen Zufallsproteinsequenzen beobachten würde.

Die Aminosäuresequenz der «La-Domäne» des 43 kD-Polypeptids von *Euplotes aediculatus* wurde mit der Sequenz der 80 kD-Telomerase-Protein-Untereinheit von *Tetrahymena thermophila* (vorstehend beschrieben) zur Untersuchung deren Ähnlichkeit verglichen. Der Sequenzvergleich ist in Fig. 39 gezeigt. In dieser Figur ist die Sequenz von *E. aediculatus* die obere Sequenz und die Sequenz von *T. thermophila* die untere Sequenz. Identitäten sind mit vertikalen Balken gekennzeichnet. Die beobachtete Identität betrug etwa 26%, während der Prozentsatz an Ähnlichkeit etwa 49% betrug. Diese Werte ähneln denen, die man mit beliebigen Zufallsproteinsequenzen beobachten würde.

Die Aminosäuresequenz einer Domäne des 43 kD-Polypeptids von *E. aediculatus* wurde auch mit La-Proteinen von zahlreichen anderen Organismen verglichen. Diese Vergleiche sind in Fig. 41 gezeigt. In dieser Figur sind hochkonservierte Reste durch weisse Buchstaben auf schwarzem Hintergrund gekennzeichnet. Reste der Sequenzen von *E. aediculatus*, die in der anderen Sequenz konserviert sind, sind durch Fettdruck gekennzeichnet.

## M. Identifizierung von Telomerase-Protein-Untereinheiten in einem anderen Organismus

In diesem Beispiel wurden die in den vorstehenden Beispielen identifizierten Sequenzen zur Identifizierung der Telomerase-Protein-Untereinheiten von *Oxytricha trifallax* verwendet. Dies ist ein Ciliat, der mit *E. aediculatus* nur sehr entfernt verwandt ist. In diesem Beispiel wurden basierend auf dem konservierten Bereich des 123 kD-Polypeptids von *E. aediculatus* Primer ausgewählt, die die Motive der reversen Transkriptase-Domäne umfassten. Geeignete Primer wurden synthetisiert und in einer PCR-Reaktion mit Gesamt-DNA von *Oxytricha* verwendet. *Oxytricha*-DNA wurde gemäss auf dem Fachgebiet bekannter Verfahren präpariert. Die PCR-Produkte wurden danach unter Verwendung von auf dem Fachgebiet bekannter Verfahren kloniert und sequenziert.

Die für die Primer verwendeten Oligonucleotidsequenzen waren:

5' - (T/C)A(A/G)AC(T/A/C)AA(G/A)GG(T/A/C)AT(T/C)CC(C/T/A)(C/T)A(G/A)GG-3'

5'-(G/A/T)GT(G/A/T)ATNA(G/A)NA(G/A)(G/A)TA(G/A)TC(G/A)TC-3'

Positionen, die degeneriert waren, sind in Klammern gezeigt, wobei die alternativen Basen in den Klammern gezeigt sind. «N» entspricht einem beliebigen Nucleotid aus den vier Nucleotiden.

Die PCR-Reaktion (50 µl) enthielt 0,2 mM dNTPs, 0,3 µg chromosomale DNA von *Oxytricha trifallax*, 1 µl Taq-Polymerase (Boehringer Mannheim), jeweils 2 µM Primer, 1 × Reaktionspuffer (Boehringer Mannheim). Das Reaktionsgemisch wurde in einem «Thermocycler» (Perkin-Elmer) unter den folgenden Bedingungen inkubiert: 1 × 5 Minuten bei 95°C, 30 Cyclen jeweils 1 Minute bei 94°C, 1 Minute bei 53°C und 1 Minute bei 72°C, danach 1 × 10 Minuten bei 72°C. Das PCR-Produkt wurde gelgereinigt und mittels des Didesoxy-Verfahrens (siehe z.B. Sanger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. 74 (1977), 5463–5467) oder anderer auf dem Fachgebiet bekannter Verfahren sequenziert.

Von dem PCR-Produkt wurde die Aminosäuresequenz abgeleitet und mit der Sequenz von *E. aediculatus* verglichen. Fig. 47 zeigt die Ausrichtung dieser Sequenzen, wobei die Sequenz von *O. trifallax* in der oberen Reihe gezeigt ist und die *E. aediculatus*-Sequenz in der unteren Reihe gezeigt ist. Wie aus dieser Figur ersichtlich ist, besteht ein grosser Grad an Homologie zwischen der in diesem Beispiel identifizierten *O. trifallax* Polypeptidsequenz und der Polypeptidsequenz von *E. aediculatus*. Somit ist es klar, dass die in der vorliegenden Erfindung identifizierten Sequenzen für die Identifizierung von homologen Telomerase-Protein-Untereinheiten in anderen eukaryotischen Organismen von Nutzen sind. Tatsächlich konnten aufgrund der Erfindungsmassen Entwicklung homologe Telomerase-Sequenzen in zahlreichen unterschiedlichen Spezies identifiziert werden.

## N. Identifizierung von Telomerase-Sequenzen von Tetrahymena

In diesem Beispiel wurde ein Tetrahymena-Clon erzeugt, der Homologie mit den Euplotes-Sequenzen und EST2p aufweist.

Bei diesem Experiment wurde ein PCR mit degenerierten Oligonucleotidprimern verwendet, die gegen konservierte Motive gerichtet waren, um so Homologiebereiche zwischen Tetrahymena-, Euplotes- und EST2p-Sequenzen identifizieren zu können. Das in diesem Beispiel verwendete PCR-Verfahren stellt ein neues Verfahren dar, das zur spezifischen Amplifikation von seltenen DNA-Sequenzen aus komplexen Gemischen entworfen wurde. Bei diesem Verfahren wird das Problem der Amplifikation von DNA-Produkten mit dem gleichen PCR-Primer an beiden Enden (d.h. Produkte eines einzelnen Primers), dem man in PCR-Clonierungsverfahren üblicherweise begegnet, vermieden. Durch diese Produkte eines einzelnen Primers wird ein unerwünschter Hintergrund erzeugt und dies kann oft die Amplifikation und den Nachweis des gewünschten Produkts von zwei Primern erschweren. Bei diesem in diesen Experimenten verwendeten Verfahren wird bevorzugt auf Produkte von zwei Primern selektiert. Das Besondere ist, dass ein Primer biotinyliert ist und der andere nicht. Nach mehreren PCR-Amplifikationsrunden werden die Produkte unter Verwendung von magnetischen Streptavidin-Kügelchen gereinigt und Produkte von zwei Primern werden mittels Hitzedenaturierung spezifisch eluiert. Dieses Verfahren findet auch im Rahmen anderer Experimente, die in diesen Beispielen nicht beschrieben wurden, seine Verwendung. Tatsächlich ist dieses Verfahren bei Anwendungen in Gebrauch, bei denen es wünschenswert ist, seltene DNA-Sequenzen zu amplifizieren, wozu die einleitenden Schritte bei Clonierungsverfahren, beispielsweise 5' und 3', gehören, RACE und jedes Verfahren, das in der PCR degenerierte Primer verwendet.

Ein erster PCR-Lauf wurde unter Verwendung von macronucleärer DNA von Tetrahymena als Matrize durchgeführt, die gemäss auf dem Fachgebiet bekannter Verfahren isoliert wurde. Es wurde ein 24-mer-Vorwärts-Primer verwendet mit der Sequenz 5'-Biotin-GCCTATTT(TC)TT(TC)TA(TC)(GATC)(GATC)(GATC)AC(GATC)GA-3', die als «K231» bezeichnet wird, und dem FFYXTE-Bereich entspricht und der 23-mer-Rückwärts-Primer mit der Sequenz 5'-CCAGATAT(GATC)A(TGA)(GATC)A(AG)(AG)AA(AG)TC(AG)TC-3', der als «K220» bezeichnet wird und dem DDFL(FIL)-Bereich entspricht. Diese PCR-Reaktion enthielt 2,5 µl DNA (50 ng), jeweils 4 µl Primer (20 µM), 3 µl 10 × PCR-Puffer, 3 µl 10 × dNTPs, 2 µl Mg, 0,3 µl Taq und 11,2 µl dH<sub>2</sub>O. Mit dem Gemisch wurden 8 Cyclen durchgeführt, jeweils 45 Sekunden bei 94°C 45 Sekunden bei 37°C und 1 Minute bei 72°C.

Das Gemisch der PCR-Reaktion wurde an 200 µl magnetische Streptavidin-Kügelchen gebunden, mit 200 µl TE gewaschen, in 20 µl dH<sub>2</sub>O resuspendiert und danach durch 2minütiges Kochen bei 100°C hitzedenaturiert. Die Kügelchen wurden heruntergezogen und das Eluat wurde entfernt. Danach wurden 2,5 µl dieses Eluats erneut unter den vorstehenden Bedingungen amplifiziert, mit der Ausnahme, dass 0,3 µl α-<sup>32</sup>P dATP enthalten war und 33 PCR-Cyclen durchgeführt wurden. Das Reaktionsgemisch wurde auf einem denaturierendem 5%igen Polyacrylamidgel aufgetrennt und der geeignete Bereich aus dem Gel ausgeschnitten. Diese Produkte wurden mit weiteren 34 Cyclen unter den vorstehend aufgezählten Bedingungen erneut amplifiziert, ausser, dass die Anlagerungstemperatur 42°C betrug.

Ein zweiter PCR-Lauf wurde unter Verwendung von makronucleärer DNA von Tetrahymena, die unter Verwendung von auf dem Fachgebiet bekannten Verfahren isoliert wurde, als Matrize durchgeführt, wobei der 23-mer-Vorwärts-Primer mit der Sequenz 5'

ACAATG(CA)G(GATC)(TCA)T(GATC)(TCA)T(GATC)CC(GATC)AA(AG)AA-3'

mit der Bezeichnung «228» verwendet wurde, der nach dem Bereich R(LI) (LI)PKK entspricht und eines reversen Primers mit der Sequenz 5'-

ACGAATC(GT)(GATC)GG(TAG)AT(GATC)(GC)(TA)(AG)TC(AG)TA(AG)CA 3'

mit der Bezeichnung «K224», der dem CYDSIPR-Bereich entspricht. Diese PCR-Reaktion enthielt 2,5 µl DNA (50 ng), jeweils 4 µl Primer (20 µM), 3 µl 10 × PCR-Puffer, 3 µl 10 × dNTPs, 2 µl Mg, 0,3 µl α-<sup>32</sup>P-dATP, 0,3 µl Taq und 10,9 µl dH<sub>2</sub>O. Das Reaktionsgemisch wurde auf einem denaturierendem 5%igen Polyacrylamidgel aufgetrennt und der geeignete Bereich aus dem Gel ausgeschnitten. Diese Produkte wurden mit 34 zusätzlichen Cyclen erneut unter den vorstehend angegebenen Bedingungen amplifiziert, ausser dass die Anlagerungstemperatur 42°C betrug.

10 µl des Reaktionsprodukts aus Lauf 1 wurden an magnetische Streptavidin-beschichtete Kügelchen in 200 µl TE gebunden. Die Kügelchen wurden mit 200 µl TE gewaschen und danach in 20 µl dH<sub>2</sub>O resuspendiert, hitzedenaturiert und das Eluat wurde entfernt. Das Reaktionsprodukt aus Lauf 2 wurde danach zu den Kügelchen gegeben und mit 30 µl 0,5 × SSC verdünnt. Das Gemisch wurde auf 94°C erhitzt und auf 50°C abkühlen gelassen. Das Eluat wurde entfernt und die Kügelchen wurden dreimal in 0,5 × SSC bei 55°C gewaschen. Die Kügelchen wurden danach in 20 µl dH<sub>2</sub>O resuspendiert, hitzedenaturiert, und das Eluat mit der Bezeichnung «Runde 1-Eluat» entfernt und aufbewahrt.



Zur Isolierung der Tetrahymena-Bande wurde das Runde 1-Eluat mit dem Vorwärts-Primer K228 und den reversen Primer K227 mit der Sequenz 5'-

CAATTCTC(AG)TA(AG)CA(GATC)(CG)(TA)(CT)TT(AGT)AT(GA)TC-3' (SEQ ID

5 was dem DIKSCYD-Bereich entspricht, erneut amplifiziert. Die PCR-Reaktion wurde wie vorstehend beschrieben durchgeführt. Die Reaktionsprodukte wurden auf einem 5%igen Polyacrylamidgel aufgetrennt, die etwa 295 Nucleotide entsprechende Bande aus dem Gel ausgeschnitten und sequenziert.

Der Clon mit der Bezeichnung 168-3 wurde sequenziert. Es wurde folgende DNA-Sequenz (einschliesslich der Primersequenzen) gefunden:

10 GATTACTCCCGAAGAAAGGATCTTTCCGTCCAATCATGACTTTCTTAAGAAA  
GGACAAGCAAAAAAATATTAAGTTAAATCTAAATTAAATTCTAATGGATAG  
15 CCAACTTGTGTTTAGGAATTTAAAAGACATGCTGGGATAAAAGATAGGATA  
CTCAGTCTTTGATAATAAACAAATTTTCAGAAAAATTTGCCTAATTCATAGAG  
20 AAATGGAAAAATAAAGGAAGACCTCAGCTATATTATGTCACTCTAGACATA  
AAGACTTGCTAC

25 Eine zusätzliche Sequenz dieses Gens wurde mittels PCR erhalten, wobei ein neuer Primer verwendet wurde, der so konstruiert war, dass er mit der Sequenz von 168-3 («K2-97» mit der Sequenz 5'-GAGTGACATAATATACGTGA-3'; paart und der Primer K231 (FFYXTE). Die Sequenz des aus dieser Reaktion erhaltenen Fragments, zusammen mit 1683 ist wie folgt (ohne die Primersequenzen):

30 AAACAACAAGGAAGGAAGTCAAATATTCTATTACCGTAAACCAATATGGAA  
ATTAGTGAGTAAATTAAGTAACTATTGTCAAAGTAAGAATTTAGTTTTCTGAAAAG  
AATAAATAAATGAAAAATAATTTTTATCAAAAAATTTAGCTTGAAGAGGAG  
35 AATTTGGAAAAAGTTGAAGAAAAATTGATACCAGAAGATTCATTTTAGAAA  
TACCCTCAAGGAAGCTAAGGATTATACCTAAAAAAGGATCTTTCCGTCCA  
ATCATGACTTTCTTAAGAAAGGACAAGCAAAAAAATATTAAGTTAAATCTA  
40 AATTAAATTCTAATGGATAGCCAACTTGTGTTTAGGAATTTAAAAGACATG  
CTGGGATAAAAGATAGGATACTCAGTCTTTGATAATAAACAAATTTTCAGAA  
45 AAATTTGCCTAATTCATAGAGAAATGGAAAAATAAAGGAAGACCTCAGCTA  
TATTATGTCACTCTA

50 Die diesem DNA-Fragment entsprechende Aminosäuresequenz ist:

KHKEGSQIFYRKPIWKL VSKLTIVKVRIQFSEKNKQMKNNFYQKIQLEENLE  
55 KVEEKLIPEDSFQKYPQGKLRIPKKGSRPIMTFLRKDKQKNIKLNLNQILMDS  
QLVFRNLKDMLGQKIGYSVFDNKQISEKFAQFIEKWKNKGRPQLYYVTL

60 Diese Aminosäuresequenz wurde gegen andere Telomerase-Gene (EST2p und Euplotes) ausgerichtet. Die Ausrichtung ist in Fig. 53 gezeigt. Eine «Consensus»-Sequenz ist in dieser Figur ebenfalls gezeigt.

65

## P. Identifizierung von T lomerase-Sequenzen von *Schizosaccharomyces pombe*

In diesem Beispiel wurde die *tez1*-Sequenz von *S. pombe* als ein Homologes von p123 von *E. a. dicalatus* und Est2p von *S. cerevisiae* identifiziert.

5 Fig. 55 zeigt eine Zusammenfassung dieser Experimente. In dieser Figur zeigt der obere Bereich (Teil A) die Beziehung zwischen den beiden überlappenden genomischen Clonen und den Bereich von 5825 bp, der sequenziert wurde. Die mit «*tez1*» bezeichnete Region entspricht dem Protein codierenden Bereich, wobei auch die flankierenden Sequenzen gezeigt sind. Die Box unterhalb des Bereichs von 5825 bp ist ein HindIII-Fragment von etwa 2 kb, das zur Herstellung des *tez1*-Disruptionskonstrukts, wie nachstehend beschrieben, verwendet wurde.

10 Die untere Hälfte von Fig. 55 (Teil B) ist ein «aufgeschlüsseltes» Schema des gleichen DNA-Bereichs. Die als «Original-PCR» bezeichnete Sequenz ist das ursprüngliche degenerierte PCR-Fragment, das mit dem degenerierten Oligonucleotid-Primerpaar erzeugt wurde, das auf der Basis der Sequenz von Motiv 4 (B') und Motiv 5 (C) von *Euplotes*, wie in den vorstehenden Beispielen beschrieben, entworfen worden war.

### i) PCR mit degenerierten Primern

20 Eine PCR unter Verwendung der genetischen Primer wurde verwendet, um in *S. pombe* das zu p123 von *E. aedicularis* homologe Protein zu finden. Fig. 56 zeigt die Sequenzen der in dieser Reaktion verwendeten degenerierten Primer (bezeichnet als «poly 4» und «poly 1»). Die PCR-Läufe wurden unter den gleichen Pufferbedingungen wie in den vorstehenden Beispielen beschrieben durchgeführt (siehe beispielsweise den vorstehenden Teil K) mit einer 5minütigen «ramp»-Zeit von 94°C, wonach sich Cycles für jeweils 30 Sekunden bei 94°C, 45 Sekunden bei 50°C und Sekunden bei 72°C anschlossen, dann 7 Minuten bei 72°C, und anschließend wurde das Reaktionsgemisch bei 4°C aufbewahrt. Die PCR-Läufe wurden unter unterschiedlichen Bedingungen durchgeführt (d.h. verschiedene Konzentrationen an DNA von *S. pombe* und verschiedene  $MgCl_2$ -Konzentrationen). Die PCR-Produkte wurden auf Agarosegelen aufgetrennt und mit Ethidiumbromid wie vorstehend beschrieben angefärbt. Verschiedene PCR-Läufe ergaben die Produktion von 3 Banden (mit «T», «M1» und «B») bezeichnet). Diese Banden wurden unter den gleichen Bedingungen wie vorstehend beschrieben erneut amplifiziert und auf Gelen aufgetrennt. Nach dieser erneuten Amplifikation wurden vier Banden beobachtet («T», «M1», «M2» und «B»), wie in Fig. 57 gezeigt. Diese vier Banden wurden dann unter den gleichen Bedingungen wie vorstehend beschrieben erneut amplifiziert. Die dritte Bande von dem oberen Bereich der Spur in Fig. 57 wurde als eine Bande identifiziert, die die richtige Sequenz für ein Telomerase-Protein enthält. Es zeigte sich, dass das mit M2 bezeichnete PCR-Produkt zu anderen Telomerase-Proteinen relativ gut passt, wie dies in Fig. 58 gezeigt ist. Zusätzlich zu der gezeigten Ausrichtung zeigt diese Figur auch die tatsächliche Sequenz von *tez1*. In dieser Figur bezeichnen Sternchen Reste, die alle vier Sequenzen gemeinsam haben (*Oxytricha* «OT»; *E. aedicularis* «Ea\_p123», *S. cerevisiae* «Sc\_p103» und M2), und die Kreise (d.h. Punkte) kennzeichnen ähnliche Aminosäurereste.

### ii) 3'-RT-PCR

45 Um eine zusätzliche Sequenzinformation zu erhalten, wurden 3'- und 5'-RT-PCR an dem in Fig. 58 angegebenen Telomerase-Kandidaten durchgeführt. Fig. 59 zeigt ein Schema der verwendeten 3'-RT-PCR-Strategie. Zuerst wurde mittels des Oligonucleotidprimers «Qr» (5'-CCA GTG AGC AGA GTG ACG AGG ACT CGA GCT CAA GCT TTT TTT TTT TTT TT-3'; aus mRNA cDNA präpariert, danach diese cDNA als eine Matrize für OCR mit «Qo» (5'-CCA GTG AGC AGA GTG ACG-3'; verwendet und ein Primer auf der Basis der ursprünglichen degenerierten PCR-Reaktion entworfen, (d.h. «M2-T» mit der Sequenz 5'-G TGT CAT TTC TAT ATG GAA GAT TTG ATT GAT G-3'). Die zweite PCR-Reaktion (d.h. «nested» PCR) wurde mit «Qi» (5'-GAG GAC TCG AGC TCA AGC-3'); und einem weiteren PCR-Primer, der mit einer Sequenz entworfen wurde, die von der ursprünglichen degenerierten PCR-Reaktion stammte oder «M2-T2» mit der Sequenz 5'-AC CTA TCG TTT ACG AAA AAG AAA GGA TCA GTG-3'; durchgeführt. Die in dieser PCR verwendeten Puffer entsprachen den vorstehend beschriebenen, wobei die durchgeführte Amplifikation mit einem 5minütigen «ramp up» bei 94°C begann, wonach sich 30 Cycles von jeweils 30 Sekunden bei 94°C, 30 Sekunden bei 55°C und 3 Minuten bei 72°C anschlossen, danach wurde 7 Minuten bei 72°C inkubiert. Die Reaktionsprodukte wurden bis zu ihrer Verwendung bei 4°C aufbewahrt.

### iii) Screenen von genomischen und cDNA-Banken

60 Nach Erhalt dieser zusätzlichen Sequenzinformation wurden verschiedene genomische und cDNA-Banken gescreent, um somit alle Banken identifizieren zu können, die diesen Kandidaten für das Telomerase-Gen enthielten. Die verwendete Vorgehensweise sowie die Genbanken und Ergebnisse sind in Fig. 60 gezeigt. In dieser Figur werden in Teil A die in diesem Experiment getesteten Genbanken aufgezählt; Teil B zeigt die verwendeten Bereiche; die Teile C und D zeigen die mit diesen Banken erhal-

tenen Ergebnisse der Dot-Blot-Hybridisierung. Positiv Banken wurden dann zum Erhalt des genomischen *tez1*-Gens und einer cDNA-Version des *tez1*-Gens durch Koloniehybridisierung gescreent. In diesem Experiment wurden etwa  $3 \times 10^4$  Kolonien von der genomischen HindIII-Bank g screened und es konnten sechs positive Clone identifiziert werden ( etwa 0,01%). Danach wurde DNA von zwei unabhängigen Clonen (A5 und B2) präpariert. Fig. 61 zeigt die mit den HindIII-gespaltenen positiven genomischen Clone A5 und B2 erhaltenen Ergebnisse.

Zusätzlich wurden cDNA-REP-Banken verwendet. Es wurden etwa  $3 \times 10^5$  Kolonien gescreent und es konnten 5 positive Clone (0,002%) identifiziert werden. Von drei unabhängigen Clonen (2-3, 4-1 und 5-20) wurde DNA präpariert. In späteren Experimenten wurde herausgefunden, dass 2-3 und 5-20 identische Insertionen enthielten.

#### iv) 5'-RT-PCR

Da die cDNA-Version des Genprodukts bis zu diesem Punkt nicht vollständig war, wurde zum Erhalt eines Clons vollständiger Länge eine 5'-RT-PCR durchgeführt. Die Strategie ist schematisch in Fig. 62 gezeigt. Bei diesem Experiment wurde cDNA präpariert mittels des DNA-Oligonucleotid-Primers «M2-B» (5'-CAC TGA TCC TTT CTT TTT CGT AAA CGA TAG GT-3'); und «M2-B2» (5'-C ATC AAT CAA ATC TTC CAT ATA GAA ATG ACA-3'); die anhand von bekannten und bereits früher identifizierten Bereichen von *tez1* entworfen worden waren. Ein Oligonucleotid-Linker «PCR Adapt Sfil» mit einem phosphorylierten 5'-Ende («P») (p-GGG CCG TGT TGG CCT AGT TCT CTG CTC-3'); wurde danach mit dem 3'-Ende dieser cDNA ligiert und dieses Konstrukt wurde als die Matrize für eine «nested»-PCR verwendet. In der ersten PCR-Runde wurden PCR Adapt Sfi und M2-B als Primer verwendet. In der zweiten Runde wurde PCR Adapt Sfil (5'-GAG GAG GAG AAG AGC AGA GAA CTA GGC CAA CAC GCC CC-3'); und M2-B2 (5'-ATC AAT CAA ATC TTC CAT ATA GAA ATG ACA-3'); als Primer verwendet. «Nested»-PCR wurde zur Steigerung der Spezifität der Reaktion verwendet.

#### v) Sequenzalignierungen

Nachdem die Sequenz von *tez1* bestimmt war, wurde sie mit bereits früher beschriebenen Sequenzen verglichen. Fig. 63 zeigt die Ausrichtung von reverser Transkriptase (RT)-Domänen von katalytischen Telomerase-Untereinheiten von *S. pombe* («S.p. Tez1p»), *S. cerevisiae* («S.c. Est2p»), und *E. aediculatus* p123 (E.a. p123»). In dieser Figur bezeichnet «h» hydrophobe Reste, «p» kleine polare Reste und «c» geladene Reste. Die über der Ausrichtung angegebenen Aminosäurereste zeigen das «Consensus»-RT-Motiv von Y. Xiong und T.H. Eickbush (Y. Xiong und T.H. Eickbush, EMBO J. 9 (1990) 3353-3362). Die Sternchen bezeichnen die Reste, die in allen drei Proteinen konserviert sind. «Motiv 0» wurde hier als ein Motiv identifiziert, das spezifisch für diese Telomerase-Untereinheit ist und im allgemeinen in reversen Transkriptasen nicht gefunden wird. Es ist somit wertvoll, um andere Aminosäuresequenzen als gute Kandidaten für katalytische Telomerase-Untereinheiten identifizieren zu können.

Fig. 64 zeigt die Ausrichtung der gesamten Sequenzen von *Euplotes* («Ea\_P123»), *S. cerevisiae* («Sc\_Est2P») und *S. pombe* («Sp\_Tez1p»). In Teil A kennzeichnen schattierte Bereiche Reste, die beide Sequenzen gemeinsam haben. In Teil B bezeichnen schattierte Bereiche Reste, die alle drei Sequenzen gemeinsam haben.

#### vi) Genetische Disruption von *tez1*

In diesem Beispiel wurden die Auswirkungen einer Disruption von *tez1* untersucht. Da Telomerase an der Telomer-Beibehaltung beteiligt ist, wurde davon ausgegangen, dass, falls *tez1* tatsächlich ein Telomerase-Bestandteil ist, die Disruption von *tez1* zu einer graduellen Telomer-Verkürzung führen sollte.

In diesen Experimenten wurde zur spezifischen Disruption des *tez1*-Gens in *S. pombe* homologe Rekombination verwendet. Diese Vorgehensweise ist schematisch in Fig. 65 gezeigt. Wie in Fig. 65 angegeben, wurde Wild-Typ-*tez1* gegen ein Fragment, das den *ura4*- oder *LEU2*-Marker enthielt, ausgetauscht.

Die Disruption des *tez1*-Gens wurde durch PCR bestätigt (Fig. 66) und ein Southern-Blot wurde zur Überprüfung der Telomer-Länge durchgeführt. Fig. 67 zeigt die Southern-Blot-Ergebnisse dieses Experiments. Da eine *Apal*-Restriktionsenzymstelle im unmittelbaren Anschluss zu einer Telomer-Sequenz in *S. pombe* vorhanden ist, erlaubt die Spaltung von genomischen DNA-Präparationen von *S. pombe* die Analyse der Telomer-Länge. Somit wurde DNA von *S. pombe* mit *Apal* geschnitten, die Spaltprodukte wurden auf einem Agarosegel aufgetrennt und diese dann mit einer für eine Telomer-Sequenz spezifischen Sonde hybridisiert, um so herauszufinden, ob die Telomere der disruptierten *S. pombe*-Zellen verkürzt waren. Die Ergebnisse sind in Fig. 67 gezeigt. Aus diesen Ergebnissen konnte geschlossen werden, dass eine Disruption des *tez1*-Gens eine Verkürzung der Telomere bewirkte.

## Q. Clonierung und Charakterisierung von menschlichem Telomerase-Prot in und -cDNA

In diesem Beispiel wurde die Information bezüglich der Nucleinsäuresequenz und Aminosäuresequenz für menschliche Telomerase ermittelt. Partiell homologe Sequenzen wurden zuerst mittels einer BLAST-Suche identifiziert, die mittels der Euplotes 123 kD-Peptid- und Nucleinsäuresequenzen sowie der Sequenzen des Schizosaccharomyces-Proteins und der korrespondierenden cDNA (tez1)-Sequenz. Die menschlichen Sequenzen (auch mit «hTCP1.1» bezeichnet) wurden von einem partiellen cDNA-Clon ermittelt (Clon 712562). Sequenzen von diesem Clon wurden gegen die wie in vorherigen Beispielen beschriebenen bestimmten Sequenzen ausgerichtet.

Fig. 1 zeigt die Sequenzalignment von Euplotes («p123») Schizosaccharomyces («tez1»), Est2p (d.h. das von der Est2-Nucleinsäuresequenz codierte Protein von *S. cerevisiae*, das hier auch mit «L8543.12» bezeichnet wird) und dem in dieser Vergleichssuche identifizierten menschlichen Homologen. Fig. 51 zeigt die Aminosäuresequenz von tez1 und Fig. 52 die DNA-Sequenz von tez1. In Fig. 52 sind die Introns und andere nicht codierende Bereiche mit kleinen Buchstaben dargestellt und die Exons (d.h. codierenden Bereiche) in Grossbuchstaben.

Wie in Fig. 75 gezeigt, gibt es Bereiche, die unter diesen Proteinen hochkonserviert sind. Beispielsweise zeigt sich in dieser Figur, dass es Identitätsbereiche «Motiv 0», «Motiv 1», «Motiv 2» und «Motiv 3» gibt. Die identischen Aminosäuren sind durch ein Sternchen (\*) gekennzeichnet und die ähnlichen Aminosäurereste durch einen Kreis (•). Dies zeigt, dass es Bereiche innerhalb der Telomerase-Motive gibt, die innerhalb einer grossen Anzahl von Eukaryoten, die von der Hefe über Ciliate bis zum Menschen reichen, konserviert sind. Es wird davon ausgegangen, dass weitere Organismen ebenso solche konservierten Sequenzbereiche enthalten. Fig. 49 zeigt die partielle Aminosäuresequenz des Clons, der menschliche Telomerase-Motive codiert und Fig. 50 die korrespondierende DNA-Sequenz des Genbank-Clons #AA281296.

Um die Information über die Sequenz des Genbank-Clons #AA281296 zu vervollständigen wurden die Sanger-Didesoxy-Sequenzierung und andere auf dem Fachgebiet bekannte Verfahren angewandt. Einige der bei der Sequenzierung verwendeten Primer sind in Tabelle 7 gezeigt. Diese Primer wurden so entworfen, dass sie mit dem Clon (GenBank-Zugangsnummer #AA281296) hybridisieren; dies basierte auf Sequenzkomplementarität entweder zu der Sequenz des Plasmidrückgrats oder der Sequenz der Insertion der menschlichen cDNA im Clon.

Tabelle 7 Primer

Primer	Sequenz
TCPI.1	GTGAAGGCACTGTTTCAGCG
TCPI.2	GTGGATGATTTCTTGTTGG
TCPI.3	ATGCTCCTGCGTTTGGTGG
TCPI.4	CTGGACACTCAGCCCTTGG
TCPI.5	GGCAGGTGTGCTGGACACT
TCPI.6	TTTGATGATGCTGGCGATG
TCPI.7	GGGGCTCGTCTTCTACAGG
TCPI.8	CAGCAGGAGGATCTTGTAG
TCPI.9	TGACCCCAGGAGTGGCACG
TCPI.10	TCAAGCTGACTCGACACCG
TCPI.11	CGGCGTGACAGGGCTGC
TCPI.12	GCTGAAGGCTGAGTGTCC
TCPI.13	TAGTCCATGTTTACAATCG

Anhand dieser Experimente wurde herausgefunden, dass die EcoRI-NotI-Insertion des Genbank-Clons #AA281296 nur einen partiellen offenen Leserahmen für das menschliche Telomerase-Protein enthält, allerdings könnte er ein aktives Fragment dieses Proteins codieren. Der offene Leserahmen im Clon codiert ein Protein von etwa 63 kD. Die Sequenz des längsten ermittelten offenen Leserahmens ist in Fig. 68 gezeigt. Der offene Leserahmen (ORF) beginnt an dem ATG-Codon mit dem in der Figur gekennzeichneten «met». Der poly-A-Schwanz am 3'-Ende der Sequenz ist ebenfalls gezeigt. Fig. 69 zeigt eine vorläufige Ausrichtung von reverser Transkriptase-Proteinen von Telomerase von der menschlichen Sequenz (menschliches Telomerase «Core Protein 1», «HS TCP1»), *E. aediculatus* p123 («Ep p123»), *S. pombe* tez1 («Sp Tez1»), *S. cerevisiae* EST2 («Sc Est2») und der «Consensus»-Sequenz. In dieser Figur sind verschiedene Motive angegeben.

Um einen vollständigen Clon zu erhalten, wurden die Hybridisierung einer cDNA-Bank und 5'-RACE durchgeführt, um so Clone zu erhalten, die Bereiche von bisher nicht clonierten Bereichen codieren. In diesen Experimenten wurde zur Erzeugung von Material für eine Sequenzanalyse RACE angewandt (schnelle Amplifikation von cDNA-Enden, «Rapid Amplification of cDNA Ends»; siehe z.B. M. A. Frohman, «RACE: Rapid Amplification of cDNA Ends», in Innis et al. (Herausg.) PCR-Protocols: A Guide to Methods and Applications (1990) S. 2838, und Frohman et al., Proc. Natl. Acad. Sci. 85 (1988) 8998–9002). Vier solcher Clone wurden erzeugt und zur Bereitstellung zusätzlicher 5'-Sequenzinformation (pFWRP5, 6, 19 und 20) verwendet.

Zusätzlich wurden menschliche cDNA-Banken (in lambda inseriert) mit dem EcoRI-NotI-Fragment des Clons (#AA281296) hybridisiert. Ein lambda-Clon mit der Bezeichnung «lambda 25–1.1» (ATCC-Zugangsnummer #209024) wurde gefunden, der komplementäre Sequenzen enthielt. Fig. 75 zeigt eine Restriktionskarte dieses lambda-Clons. Die Insertion von humaner cDNA wurde von diesem Clon als ein EcoRI-Restriktionsfragment in die EcoRI-Stelle des im Handel erhältlichen «phagemids» pBluescriptIIISK+ (Stratagene) subcloniert, wodurch das Plasmid «pGRN121» erzeugt wurde, das bei der ATCC hinterlegt wurde (ATCC-Zugangsnummer #209016). Vorläufige Ergebnisse zeigten, dass das Plasmid pGRN121 die vollständige Sequenz des offenen Leserahmens (ORF) enthält, der das menschliche Telomerase-Protein codiert.

Die cDNA-Insertion von Plasmid pGRN121 wurde unter Verwendung von auf dem Fachgebiet be-

kannter Verfahren sequenziert. Fig. 70 zeigt eine Karte des Plasmids pGRN121 bezüglich Restriktionsstellen und Funktion, deren Bestimmung auf dieser vorläufigen Arbeit basiert. Die Ergebnisse dieser vorläufigen Sequenzanalyse sind in Fig. 71 gezeigt. Aufgrund dieser Analyse, und wie in Fig. 70 gezeigt, wurde eine vermutliche Startstelle für den codierenden Bereich bei einer Position, die etwa 50 Nucleotide von der EcoRI-Stelle entfernt liegt, gefunden (bei Position 707 gelegen) und die Lage der Telomerase-spezifischen Motive «FFYVTE», «PKP», «AYD», «QG» und «DD». Zusätzlich wurde eine vermutliche Stopstelle bei Nucleotid #3571 gefunden (siehe Fig. 72). Fig. 72 zeigt die DNA-Sequenzen und entsprechenden Aminosäuresequenzen für die offenen Leserahmen in der Sequenz («a», «b» und «c»). Aufgrund der vorläufigen Natur dieser frühen Sequenzierungsarbeiten stellte sich jedoch heraus, dass die Leserahmen für die verschiedenen Motive nicht richtig ausgerichtet sind.

Eine zusätzliche mit pGRN121 durchgeführte Analyse ergab, dass das Plasmid signifikante Bereiche des 5'-Endes der codierenden Sequenzen enthielt, die auf dem Genbank-Clon mit der Zugangsnummer #AA281296 nicht vorhanden sind. Es stellte sich weiterhin heraus, dass pGRN121 eine Variante der codierenden Sequenz enthält, die eine Insertion von etwa 182 Nucleotiden enthält. Es zeigte sich, dass diese Insertion in dem Genbank-Clon mit der Zugangsnummer #AA281296 fehlt. Solche Varianten können wie die *E. aediculatus*-Sequenzen in funktionellen Assays getestet werden, beispielsweise Telomerase-Assays, um so das Vorhandensein einer funktionellen Telomerase in einer Probe nachweisen zu können.

Durch eine weitere Sequenzanalyse konnte die cDNA-Sequenz von pGRN121 bestimmt werden, wobei ein zusammenhängender offener Leserahmen gefunden wurde, der ein Protein mit einem Molekulargewicht von etwa 127 000 Dalton und 1132 Aminosäuren, wie in Fig. 74 gezeigt, codiert. Eine auf dieser Analyse basierende verbesserte Karte von pGRN121 ist in Fig. 73 gezeigt. Die Ergebnisse der zusätzlichen Sequenzanalyse der hTERT-cDNA sind in Fig. 16 gezeigt.

## Beispiel 2

### Die Korrelation von hTERT-Häufigkeit und Zellunsterblichkeit

Die relative Häufigkeit von hTERT-mRNA wurde in sechs Stämmen von Telomerase-negativen sterblichen Zellen und sechs Zelllinien von Telomerase-positiven unsterblichen Zellen bewertet (Fig. 5). Der Fliessgleichgewicht kleinere Spiegel von hTERT-mRNA war in unsterblichen Zellen, für die früher gezeigt werden konnte, dass sie aktive Telomerase besitzen, signifikant erhöht. Niedrigere Spiegel der hTERT-mRNA wurden in einigen Stämmen Telomerase-negativer Zellen entdeckt.

Es wurde RT-PCR für hTERT, hTR, TP1 (Telomerase-assoziiertes Protein, das mit Tetrahymena p80 verwandt ist (Harrington et al., Science 275 (1997) 973 und Nakayama et al., Cell 88 (1997), 875)) und GAPDH (um für gleiche Mengen an RNA-Matrize zu normalisieren) mit RNA ausgeführt, die von den folgenden Zellen stammte: (1) Menschliche fötale Lungenfibroblasten GFL, (2) menschliche fötale Hautfibroblasten GFS, (3) erwachsene Prostata Stromal-Fibroblasten 31 YO, (4) menschliche fötale Kniesynovial-Fibroblasten HSF, (5) neonatale Vorhaut-Fibroblasten Bi, (6) menschliche fötale Lungenfibroblasten IMR90 und die immortalisierten Zelllinien: (7) Melanom LOX IMVI, (8) Leukämie U251, (9) Lungenkrebs NCI H23, (10) Colon-Adenocarcinom SW620, (11) Brusttumor MCF7, (12) 293 Adenovirus-E1-transformierte menschliche embryonale Nierenzelllinie.

hTERT-Nucleinsäure wurde von cDNA mittels der Oligonucleotid-primers LT5 und LT6 amplifiziert (Tabelle 2) mit insgesamt 31 Cyclen (94°C 45 s, 60°C 45 s, 72°C 90 s). GAPDH wurde mittels des Primers K136 (CTCAGACACCATGGGGAAGGTGA) und K137 (ATGATCTTGAGGCTGTTGTCATA) mit insgesamt 16 Cyclen amplifiziert (94°C 45 s, 55°C 45 s, 72°C 90 s). hTR wurde mit den Primern F3B (TCTAACCCTAACTGAGAAGGGCGTAG) und R3c (GTTTGCTCTAGAATGAACGGTGAAG) mit insgesamt 22 Cyclen amplifiziert (94°C 45 s, 55°C 45 s, 72°C 90 s). TP1-mRNA wurde mit den Primern TP1.1 und TP1.2 in 28 Cyclen (die Cyclen waren die gleichen wie für hTERT) amplifiziert. Die Reaktionsprodukte wurden auf einem 8%igen Polyacrylamidgel aufgetrennt, mit «SYBR Green» (Molecular Probes) angefärbt und durch Scannen auf einem «Storm 860» (Molecular Dynamics) sichtbar gemacht. Die in Fig. 5 dargestellten Ergebnisse zeigen, dass hTERT-mRNA-Spiegel direkt mit den Spiegeln an Telomerase-Aktivität in den getesteten Zellen korrelieren.

## Beispiel 3

### Charakterisierung einer hTERT-Intron-Sequenz

Ein vermutetes Intron wurde zuerst durch PCR-Amplifikation menschlicher genomischer DNA, wie in diesem Beispiel beschrieben, identifiziert und das Ergebnis wurde im Anschluss daran durch Sequenzierung des genomischen Clons  $\lambda$ G $\phi$ 5 (siehe Beispiel 4) bestätigt. PCR-Amplifikation wurde mittels des Vorwärts-Primers TCP1.57 durchgeführt, der in Kombination mit den einzelnen reversen Primern TCP1.46, TCP1.48, TCP1.50, TCP1.52, TCP1.54, TCP1.56 und TCP1.58 kombiniert wurde (siehe Tabelle 2). Die Produkte von genomischer DNA der Amplifikation mit TCP1.57/TCP1.46, TCP1.48, TCP1.50, TCP1.52, TCP1.54 oder TCP1.56 waren etwa 100 Basenpaare länger als die Produkte der

pGRN121-Amplifikationen. Die Amplifikation mit TCP1.57/TCP1.58 war bei Verwendung genomischer DNA und pGRN121-DNA gleich. Dies zeigte, dass die genomische DNA eine Insertion zwischen den Stellen für TCP1.58 und TCP1.50 enthielt. Die PCR-Produkte von TCP1.57/TCP1.50 und TCP1.57/TCP1.52 wurden ohne Subclonierung mit den Primern TCP1.39, TCP1.57 und TCP1.49 direkt sequenziert.

Wie nachstehend gezeigt, ist die Intron-Sequenz von 104 Basen (SEQ. ID. Nr. 7) (Fig. 12) in der hTERT-mRNA (in Fettdruck gezeigt) an der Verbindung, die den Basen 274 und 275 von SEQ. ID. Nr. 1 entspricht, inseriert:

```

CCCCCGCCGCCCCCTCCTTCCGCCAG/GTGGGCCTCCCCGGGGTCCGGCG
TCCGGCTGGGGTTGAGGGCGGCCGGGGGAACCAGCGACATGCCGAGAG
CAGCGCAGGCGACTCAGGGCGCTTCCCCCGCAG/GTGTCCTGCCTGAAGG
AGCTGGTGGCCCGAGTGCTGCAG

```

«/» kennzeichnet die Spleisspunkte, die Sequenz zeigt gute Übereinstimmungen mit den «Consensus»-5'- und 3'-Spleisspunktsequenzen, die typisch für menschliche Introns sind.

Dieses Intron enthält Motive, die charakteristisch für eine Spaltstelle für Topoisomerase II sind und eine NFkB-Bindungsstelle (siehe Fig. 21). Diese Motive sind teilweise deshalb von Interesse, da die Expression von Topoisomerase II in den meisten Tumoren hoch reguliert ist. Topoisomerase II bewirkt eine Relaxierung von DNA durch Schneiden und erneutes Auffinden der DNA, wodurch die Expression bestimmter Gene erhöht wird. Es konnte gezeigt werden, dass Inhibitoren von Topoisomerase II als anti-Tumor-Agenzien wirken. Im Falle von NFkB könnte dieser Transkriptionsfaktor eine Rolle bei der Regulation von Telomerase während der terminalen Differenzierung spielen. NFkB könnte eine Rolle spielen bei der frühen Repression von Telomerase während der Entwicklung und stellt somit ein weiteres Ziel für eine therapeutische Intervention hinsichtlich der Regulierung von Telomerase-Aktivität in Zellen dar.

#### Beispiel 4

Clonierung des Lambda-phagen Gø5 und Charakterisierung von genomischen hTERT-Sequenzen

##### a) Lambda Gø5

Eine menschliche genomische DNA-Bank wurde mittels PCR und Hybridisierung gescreent, wobei ein hTERT-RNA codierende Sequenzen enthaltender genomischer Clon gefunden wurde. Bei der Bank handelt es sich um eine genomische Bank von menschlichen Fibroblasten, die mittels DNA von W138 Lungenfibroblastenzellen hergestellt wurde (Stratagene, Katalog #946204). In dieser Bank sind partielle Sau3AI-Fragmente in die XhoI-Stelle des Lambda-Vektors FIXRII (Stratagene) mit einer Insertionsgrösse von 9–22 kb inseriert.

Diese genomische Bank wurde in Pools von jeweils 150 000 Phagen aufgeteilt und jeder Pool durch «nested» PCR gescreent (äusseres Primerpaar TCP1.52 & TCP1.57; inneres Primerpaar TCP1.49 & TCP1.50, siehe Tabelle 1). Diese Primerpaare umspannen ein vermutetes Intron (siehe das vorstehende Beispiel 3) in der genomischen DNA von hTERT und sie gewährleisteten, dass das PCR-Produkt von einer genomischen Quelle stammte und nicht von einer Verunreinigung durch den hTERTcDNA-Clon. Positive Pools wurden weiter aufgeteilt, bis ein Pool von 2000 Phagen erhalten wurde. Dieser Pool wurde mit niedriger Dichte ausplattiert und durch Hybridisierung mit einem DNA-Fragment, das die Basenpaare 1552–2108 von SEQ. ID. Nr. 1 umfasst (Restriktionsstellen SphI bzw. EcoRV) gescreent.

Zwei positive Clone wurden isoliert und erneut über «nested» PCR wie vorstehend beschrieben gescreent. Beide Clone waren am Rande der PCR positiv. Einer der Clone ( $\lambda$ Gø5) wurde mit NotI gespalten, wobei sich eine Insertionsgrösse von etwa 20 kb zeigte. Die nachfolgende Kartierung (siehe unten) ergab eine Insertionsgrösse von 15 kb und zeigte, dass der Phage Gø5 etwa 13 kb an DNA stromaufwärts von der Startstelle der cDNA-Sequenz enthält.

Der Phage Gø5 wurde mittels Restriktionsenzymspaltung und DNA-Sequenzierung kartiert. Die erhaltene Karte ist in Fig. 7 gezeigt. Die Phagen-DNA wurde mit NcoI gespalten und die Fragmente in pBBS167 cloniert. Die erhaltenen Subclone wurden durch PCR gescreent, um jene zu identifizieren, die Sequenzen enthalten, die dem 5'-Bereich der hTERT-cDNA entsprechen. Ein Subclon (pGRN140), der ein NcoI-Fragment von 9 kb (mit der hTERT-Gensequenz und 4 bis 5 kb der lambda-Vektor-Sequenz) enthielt, wurde partiell sequenziert, um die Orientierung der Insertion zu bestimmen. pGRN 140 wurde zur Entfernung von lambda-Vektor-Sequenzen mit Sall geschnitten, wobei pGRN144 erhalten wurde. pGRN144 wurde danach sequenziert. Vorläufige Ergebnisse der Sequenzierung sind in Fig. 76 gezeigt und die Ergebnisse einer weiteren Sequenzierung sind in SEQ. ID. Nr. 6 (Fig. 21) bereitgestellt. Das

5'-Ende der hTERT-mRNA entspricht der Base 2441 von SEQ. ID. Nr. 6 (Fig. 21). Wie in Fig. 7 gezeigt, liegen zwei Alu-Sequenzelemente 1700 Basenpaare stromaufwärts von dem 5'-Ende der hTERT-cDNA und diese liefern wahrscheinlich die stromaufwärts gelegene Grenze hinsichtlich des Promotorbereichs von hTERT. Die Sequenz besitzt auch ein Intron, das bei der Base 4173 (SEQ. ID. Nr. 6) (Fig. 21) liegt, 3' gelegen zu dem in dem vorstehenden Beispiel 3 beschriebenen Intron.

#### b) Zusätzliche genomische Clone

Zusätzlich zu dem vorstehend beschriebenen genomischen Clon werden zwei P1-Bacteriophagenclon und ein menschlicher BAC-Clon als veranschaulichende erfindungsgemässe Ausführungsformen bereitgestellt. Die P1-Insertionen haben gewöhnlich eine Länge von 75 bis 100 kb und die BAC-Insertionen üblicherweise von mehr als 100 kb.

Die P1-Clone (DMPC-HFF#1-477(F6) -GS#15371 und DMPC-HEF#1-1103(H6) -GS#15372) wurden durch PCR-Screenen einer menschlichen P1-Bank erhalten, die von menschlichen Vorhaut-Fibroblastenzellen stammte (Shepherd et al., PNAS USA 91 (1994) 2629) wobei die Primer TCP1.12 und UTR2 verwendet wurden, die das 3'-Ende von hTERT amplifizieren. Diese Clone waren beide negativ mit Primern, die das 5'-Ende von hTERT amplifizieren (d.h. es fand keine Amplifikation statt).

Der menschliche BAC-Clon (326 E 20) wurde mittels eines Hybridisierungs-Screenings einer menschlichen genomischen BAC-Bank mittels eines 1143 bp SphI/XmnI-Fragments von SEQ. ID. Nr. 1 (Basen 1552-2695) erhalten, das den RT-Motivbereich umfasst. Es wird davon ausgegangen, dass dieser Clon das 5' enthält. Es wird davon ausgegangen, dass die genomischen hTERT-Clone in diesem Beispiel das gesamte hTERT-Gen umfassen.

#### Beispiel 5

##### Chromosomale Lage des hTERT-Gens

Das hTERT-Gen wurde auf dem Chromosom 5p durch «radiation hybrid»-Kartierung lokalisiert (Boehnke et al., Am. J. Hum. Genet. 49 (1991) 1174 und Walter et al., Nature Genet. 7 (1994) 22) unter Verwendung des «medium resolution Stanford G3 panel» von 83 RH-Clonen des gesamten menschlichen Genoms (erzeugt am Stanford Human Genome Center). Eine menschliche Lymphoblastoid-Zelllinie (Donor; rM) wurde gegen 10 000 rad Röntgenstrahlen exponiert und dann mit nicht bestrahlten Hamster-Rezipientenzellen (A3) fusioniert. 83 unabhängige Hybridclone aus somatischen Zellen wurden isoliert, wobei jeder Clon ein Fusionsereignis zwischen einer bestrahlten Donorzelle und einer Hamster-Rezipientenzelle darstellt. Die DNA von Tafel G3 wurde zum Ordnen von Markern in dem gewünschten Bereich sowie zur Etablierung der Entfernung zwischen diesen Markern verwendet.

Die für die RH-Kartierung verwendeten Primer waren TCP1.12 und UTR2, wobei 45 Cyclen mit Taq-Puffern von Boehringer Mannheim und Taq-Polymerase von Perkin-Elmer verwendet wurden, jeweils 45 Sekunden 94°C, 45 Sekunden 55°C und 45 Sekunden 72°C. Die 83 Pools wurden unabhängig voneinander amplifiziert und 14 (17%) waren positiv hinsichtlich hTERT (durch Auftreten einer Bande von 346 bp). Die Amplifikationsergebnisse wurden dem «Stanford RH server» eingegeben, der dann die Kartenposition 5p und den nächsten Marker, STS D5S678 lieferte.

Durch Abfragen der «Genethon genom mapping» - web site konnte bei der Kartierung ein YAC identifiziert werden, das den STS-Marker D5S678 enthält: CEPH YAC 780\_C\_3, Grösse: 390 660 kb. Dieses YAC enthielt auch Marker für das Chromosom 17. Dieses Ergebnis zeigte an, dass sich das hTERT-Gen auf Chromosom 5 befindet, nahe dem Telomer-Ende. In einer Reihe von Tumoren gibt es erhöhte Kopienanzahlen für 5p. Das Katzenschrei-Syndrom wurde auch zu Deletionen in diesem Bereich kartiert.

#### Beispiel 6

##### Entwurf und Konstruktion von Vektoren zur Expression von hTERT-Proteinen und -Polynucleotiden

##### Expression von hTERT in Bakterien

Das folgende Beispiel beschreibt ausführlich den Entwurf von hTERT-exprimierenden bakteriellen Expressionsvektoren, mit denen grosse Mengen an biologisch aktivem hTERT mit vollständiger Länge (SEQ. ID. Nr. 2) hergestellt werden können. Die Erzeugung von biologisch aktivem hTERT-Protein auf diese Weise ist von Nutzen für die Telomerase-Rekonstitutionsassays, für die Untersuchung von Modulatoren von Telomerase-Aktivität, für die Analyse der Aktivität von neu isolierten Spezies von hTERT, zur Identifizierung und Isolierung von Verbindungen, die spezifisch mit hTERT assoziieren, für die Analyse der Aktivität einer hTERT-Proteinvariante, die, wie vorstehend beschrieben, ortsspezifisch mutiert wurde, und als ein Immunogen, um nur einige Beispiele zu nennen.



## Der bakterielle Expressionsvektor pThioHis A/hTRT

Um grosse Mengen an hTRT (SEQ. ID. Nr. 2) mit vollständiger Länge herstellen zu können, wurde der bakterielle Expressionsvektor pThioHis A (Invitrogen, San Diego, CA) als Expressionssystem ausgewählt. Die hTRT-codierende Insertion enthält die Nucleotide 707 bis 4776 der hTRT-Insertion im Plasmid pGRN121 (SEQ. ID. Nr. 1). Diese Nucleotidsequenz enthält die vollständig codierende Sequenz des hTRT-Proteins (SEQ. ID. Nr. 2).

Dieser erfindungsgemässe Expressionsvektor kann für induzierbare Expressionen in Bakterien entworfen werden. Die Induktion der Expression kann erfolgen, um in E. coli hohe Spiegel eines Fusionsproteins zu codieren, das aus einer spaltbaren, «HIS-tagged» Thioredoxineinheit und dem hTRT-Protein mit vollständiger Länge zusammengesetzt ist. Die Verwendung des Expressionssystems erfolgte im wesentlichen gemäss den Anleitungen des Herstellers. Die Aminosäuresequenz des von dem erfindungsgemässen erhaltenen Vektor-codierten Fusionsproteins wird nachfolgend gezeigt: (-\*) kennzeichnet eine Spaltstelle für Enterokinase;

```

MSDKIIHLTDDSFDTDVLKADGAILVDFWAHWC GPCCKMIAPILDEIADEYQGKLTVAK
LRIDHNP GTAPKYGIRGIPTLLL FKNGEVAATKVGALSKGQLKEFLDANLAGSGSGDD
DDK-* -VPMHELEIFEFAAASTQRCVLLRTWEALAPATPAMP RAPRCRAVRSLLRSHY
REVLPLATFVRRLGPQGWRLVQRGDPAAFRALVAQCLVCVPWDARPPPAAPSFQVSC
LKELVARVLQRLCERGAKNVLAFGFALLDGARGGPPEAFTTSVRSYLPNTVTDALRGS
GAWGLLLRRVGDDVLVHLLARCALFVLVAPSCAYQVCGPPLYQLGAATQARPPPHASG
PRRRLGCERAWNHSVREAGVPLGLPAPGARRRGGSASRSLPLPKRPRRGAAPEPERTP
VGQGSWAHPGRTRG PSDRGFCVVSPARPAEEATSLLEGALSGTRHSHPSVGRQHHAG??
STSRRPPRPWDTPC??VYAETKHF LYS SSGDKEQLRPSFLLSSLRPSLTGARRLVETIFL
GSRPWMPGT PRRLPRLPQRYWQMRPLFLELLGNHAQCPYGVLLKTHCPLRAAVTPAAG
VCAREK PQGSVAAP EEEEDTDPRRLVQLLRQHSSPWQVYGFVRACLRLRLV??GLWGSRH
NERRFLRNTKKFISLGKHAKLSLQELTWKMSVRDCAWLRRSPGVGCVPAAEHRLREEI
LAKFLHWLMSVYVVELLRSFFYVTETTFQKNRLFFYRKSVWSKLQSIGIRQHLKRVQL
RELSEAEVRQHREARPALLTSRLRFIPKPDGLRPIVNMDYVVGARTFRREKRAERLTS
RVKALFSVLNYERARRPGLLGASVLGLDDI HRAWRTFVL RVRAQDPPPELYFVKVDVT
GAYDTIPQDRLTEVIASIIKPQNTYCVRRYAVVQKAAHGHVRKAFKSHVSTLTDLQPY
MRQFVAHLQETSPLRDAVVIEQSSSLNEASSGLFDVFLRFMCHHAVRIRGKSYVQCQG
IPQGSILSTLLCSLCYGD MENKLFAGIRRDGLLLRLVDDFLLVTPHLTHAKTFLRTL V
RGVPEYGCVVNLRKTVVNF PVEDEALGGTAFVQMPAHGLFPWCGLLLDTRTLEVQSDY
SSYARTSIRASLTFNRGFKAGRNMRRKLFGLVRLKCHSLFLDLQVNSLQTVCTNIYKI
LLLQAYRFHACVLQLPFHQQVWKNPTFFLRVISDTASLCYSILKAKNAGMSLGAKGAA
GPLPSEAVQWLCHQAFLLKLTRHRVTYVPLLGSLRTAQTQLSRKLP GTTTLTALEAAAN
PALPSDFKTILD

```

pGEX-2TK mit den hTRT-Nucleotiden 3272 bis 4177 von pGRN121

Dieses erfindungsgemässe Konstrukt wird für die Herstellung von Fusionsproteinen verwendet, beispielsweise um polyclonale und monoclonale Antikörper gegen das hTRT-Protein erhalten zu können. Fragmente von hTRT können auch für andere Zwecke verwendet werden, beispielsweise zur Modulation von Telomerase-Aktivität, z.B. als eine dominant-negativ Mutante oder um die Assoziierung von Telomerase mit anderen Proteinen oder Nucleinsäuren zu verhindern.

Zur Produktion grosser Mengen eines hTRT-Proteinfragments wurde der E. coli-Expressionsvektor pGEX-2TK (Pharmacia Biotech, Piscataway N.J.) ausgewählt und im wesentlichen nach den Anleitungen des Herstellers verwendet. Damit wurde ein erfindungsgemässes Expressionssystem hergestellt. Das erhaltene Konstrukt enthält eine Insertion, die von den Nucleotiden 3272 bis 4177 der hTRT-Insertion im Plasmid pGRN121 stammt. Der Vektor steuert die Expression von hohen Spiegeln eines Fusionsproteins in E. coli, das aus der Glutathion-S-Transferase-Sequenz (nachstehend unterstrichen), der Spalt-Sequenz für Thrombin (doppelt unterstrichen), der Erkennungssequenz für Herzmuskel-Proteinkinase (kursiv), durch Clonierung eingeführte Reste (in Klammern, GSVTK) und dem hTRT-Proteinfragment (in Fettdruck) (SEQ. ID. Nr. 38) wie nachfolgend gezeigt, zusammengesetzt ist:

MSPILGYWKIKGLVOPTRLILEYLEEKYEEHLVERDEGDKWRNKKFELGLEFPNL  
PDGDVKLTOSMAIRYIADKHNMLGGCPKERAESIMLEGAVLDIRYGVSR  
IAYSKDFE  
TLKVDLFLSKLPEMLKMFEDRLCHKTYLNGD-VTHPDEMLYDALDVVLYMDP  
MCLDAFP  
KLVCFFKKRIEAIPOIDKYLKSSKYIAWPLOGWOATFEGGGDHPKSDLVPRGS  
RRA  
SVI  
GSVTK] IPQGSILSTLLCSLCYGD MENKLFAGIRRDGLLLRLVDDFLLVTPHLTHART  
 25 FLRTLVRGVPEYGCVVNLRKTVVNFPVEDEALGGTAFVQMPAHGLFPWCGLLLDTRL  
 EVQSDYSSYARTSIRASVTFNRGFKAGRNMRRKLFGLRLKCHSLFLDLQVNSLQTV  
 C  
 TNYKILLQLQAYRFHACVLQLPFHQVWKNPTFFLRVISDTASLCYSILKAKNAGMSL  
 30 GAKGAAGPLPSEAVQWLCHQAFLLKLTRHRVTYVPLLGLSLRTAQTQLSRKLP  
 GTTLTA  
 LEAAANPALPSDFKTILD

Bei der Expression dieses Fusionsproteins wurden unlösliche Aggregate gebildet. Es wurde allgemein wie vorstehend im Abschnitt «Reinigung von Proteinen aus Einschlusskörperchen» behandelt. Dabei wurden induzierte Zellen in PBS (20 mM Natriumphosphat, pH-Wert 7,4 und 150 mM NaCl) suspendiert und durch Ultraschallbehandlung aufgebrochen. NP-40 wurde bis zu 0,1% zugegeben und das Gemisch 30 Minuten bei 4°C unter leichtem Mischen inkubiert. Das unlösliche Material wurde durch 30minütige Zentrifugation mit 25 000 g bei 4°C gewonnen. Das unlösliche Material wurde einmal in 4 M Harnstoff in PBS gewaschen, durch Zentrifugation gewonnen und dann erneut in PBS gewaschen. Es wurde geschätzt, dass das gewonnene Pellet mehr als 75% Fusionsprotein enthielt. Dieses Material wurde in einem Vakuum schnell getrocknet, danach für die Injektion in Mäuse und Kaninchen zur Erzeugung von Antikörpern in einem Adjuvans suspendiert. Die Abtrennung des rekombinanten Proteins von der Glutathion-S-Transferase-Einheit wird durch ortsspezifische Proteolyse mittels Thrombin gemäss den Anleitungen des Herstellers durchgeführt.

pGEX-2TK mit den Nucleotiden 2426 bis 3274 von pGRN121 mit einem «HIS-8-Tag»

Zur Herstellung grosser Mengen eines Fragments von hTRT wurde ein weiteres E. coli-Expressionsvektor pGEX-2TK (Pharmacia Biotech, Piscataway N.J.)-Konstrukt hergestellt. Dieses Konstrukt enthält eine Insertion, die von den Nucleotiden 2426 bis 3274 der hTRT-Insertion im Plasmid pGRN121 (SEQ. ID. Nr. 1) und eine Sequenz, die acht aufeinanderfolgende Histidinreste codiert (HIS-8-Tag). Um dieses «HIS-8-Tag» zu inserieren, wurde der Vektor pGEX-2TK mit den hTRT-Nucleotiden 2426 bis 3274 von pGRN121 mit BamHI linearisiert. Dadurch wird das Plasmid an der Verbindung zwischen GST-Thrombin-Herzmuskelproteinase und der hTRT codierenden Sequenz geöffnet. Zu dem linearisierten Plasmid wurde ein doppelsträngiges Oligonucleotid mit BamHI-kompatiblen Enden, wie dies in der nachstehend gezeigten Sequenz zu sehen ist, ligiert, was die Einführung von acht Histidin-Resten stromaufwärts der hTRT-Sequenz im Leserahmen ergab.

Der Vektor steuert in E. coli die Expression von hohen Spiegeln eines Fusionsproteins, das zusammengesetzt ist aus der Glutathion-S-Transferase-Sequenz (unterstrichen); der Spaltsequenz für Thrombin (doppelt unterstrichen); der Erkennungssequenz für Herzmuskel-Proteinkinase (kursiv); einem Satz von drei und einem Satz von fünf Resten, die durch Clonierung eingeführt wurden (GSV und GSVTK) acht auf inanderfolgenden Histidinen (auch doppelt unterstrichen) und dem hTRT-Proteinfragment (in Fettdruck) (SEQ. ID. Nr. 39):

MSPILGYWKIKGLVOPTRLLEYLEEKYEEHLYERDEGDKWRNKKFELGLEFP  
 NLPYYIDGDVKLTOSMAIRYIADKHNMLGGCPKERAISMLEGAVLDIRYGVSR  
 RIAYSKDFETLKVDFLSKLPEMLKMFEDRLCHKTYLNGDHVTHPDEMLYDAL  
 5 DVVLYMDPMCLDAFPKLVCFKKRIEAIPOIDKYLKSSKYIAPLOGWOATEGG  
 GDHPPKSDLVPRGSRRA<sup>SV</sup>[GSV]HHHHHHHH[GSVTK]MSVYVVELLSFFYV  
 TETTFQKNRLFFYRPSVWSKLQSIGIRQHLKRVQLRELSEAEVRQHREARP  
 10 ALLTSRLRFIPKPDGLRPVNM DYVVGARTFRREKRAERLTSRVKALFSVL  
 NYERARRPGLLGASVLGLDDIHRAWRTFVLRVRAQDPPELYFVKVDVTG  
 AYDTIPQDRLTEVIASIIKPQNTYCVRRYAVVQKAAHGHRKAFKSHVSTL  
 15 TDLQPYMRQFVAHLQETSPLRDAVVIEQSSSLNEASSGLFDVFLRFMCHHA  
 VRIRGKSYVQCQGI

Dieser Vektor kann zur Herstellung von Fusionsprotein zur Erzeugung von polyclonalen und monoclonalen Antikörpern gegen ein hTERT-Protein verwendet werden. Dieses Fusionsprotein kann ausserdem dazu verwendet werden, um gegen hTERT-Peptide, die innerhalb des Fusionsproteins enthalten sind, gerichtete Antikörper einer Affinitätsreinigung zu unterwerfen. Die Abtrennung des rekombinanten Proteins von der Glutathion-S-Transferase-Einheit kann durch ortsspezifische Proteolyse mittels Thrombin gemäss den Anweisungen des Herstellers erzielt werden.

25 pGEX-2TK mit den hTERT-Nucleotiden 2426 bis 3274 von pGRN121 ohne «HIS-8-TAG»

Zur Herstellung grosser Mengen eines hTERT-Fragments wurde ein anderes E. coli-Expressionsvektor pGEX-2TK (Pharmacia Biotech, Piscataway N.J.)-Konstrukt hergestellt. Dieses Vektorkonstrukt kann zur Herstellung von Fusionsprotein für die Erzeugung von polyclonalen und monoclonalen Antikörpern gegen das hTERT-Protein verwendet werden. Dieses Fusionsprotein kann ausserdem dazu verwendet werden, gegen hTERT-Peptide, die in dem Fusionsprotein enthalten sind, gerichtete Antikörper einer Affinitätsreinigung zu unterwerfen.

Dieses Konstrukt enthält eine Insertion, die von den Nucleotiden 2426 bis 3274 der hTERT-Insertion im Plasmid pGRN121 (SEQ. ID. Nr. 1) stammt, jedoch ohne das «His-8-tag». Der Vektor steuert in E. coli die Expression von hohen Spiegeln eines Fusionsproteins, das zusammengesetzt ist aus Glutathion-S-Transferase (unterstrichen), einer Spaltsequenz für Thrombin (doppelt unterstrichen), einer Erkennungssequenz für die Herzmuskel-Proteinkinase (kursiv), durch Clonierung eingeführte Reste (in Klammern, GSVTK) und das hTERT-Proteinfragment (in Fettdruck) (SEQ. ID. Nr. 40):

40 MSPILGYWKIKGLVOPTRLLEYLEEKYEEHLYERDEGDKWRNKKFELGLEFPNLPYY  
 IDGDVKLTOSMAIRYIADKHNMLGGCPKERAISMLEGAVLDIRYGVSRRIAYSKDFE  
 TLKVDFLSKLPEMLKMFEDRLCHKTYLNGDHVTHPDEMLYDALDVVLYMDPMCLDAFP  
 45 KLVCFKKRIEAIPOIDKYLKSSKYIAPLOGWOATEGGGDHPPKSDLVPRGSRRA<sup>SV</sup>[  
 GSVTK]MSVYVVELLSFFYVTETTFQKNRLFFYRPSVWSKLQSIGIRQHLKRVQLRE  
 LSEAEVRQHREARPALLTSRLRFIPKPDGLRPVNM DYVVGARTFRREKRAERLTSRK  
 ALFSVLNYERARRPGLLGASVLGLDDIHRAWRTFVLRVRAQDPPEYFVKVDVTGAYD  
 50 TIPQDRLTEVIASIIKPQNTYCVRRYAVVQKAAHGVRKAFKSHVSTLTDLQPYMRQFV  
 AHLQETSPLRDAVVIEQSSSLNEASSGLFDVFLRFMCHHAVRIRGKSYVQCQGI

Die Abtrennung des rekombinanten Proteins von der Glutathion-S-Transferase-Einheit kann durch ortsspezifische Proteolyse mittels Thrombin gemäss den Angaben des Herstellers erzielt werden.

55 pGEX-2TK mit den hTERT-Nucleotiden 1625 bis 2458 von gPRN121

Zur Herstellung grosser Mengen eines hTERT-Proteinfragments wurde ein weiteres E. coli-Expressionsvektor pGEX-2TK (Pharmacia Biotech, Piscataway N.J.)-Konstrukt hergestellt. Dieses Vektorkonstrukt kann zur Herstellung von Fusionsprotein zur Erzeugung polyclonaler und monoclonaler Antikörper gegen ein hTERT-Protein verwendet werden. Darüber hinaus kann dieses Fusionsprotein dazu verwendet werden, gegen hTERT-Peptide, die in dem Fusionsprotein enthalten sind, gerichtete Antikörper einer Affinitätsreinigung zu unterwerfen.

Dieses Konstrukt enthält eine Insertion, die von den Nucleotiden 1625 bis 2458 der hTERT-Insertion

im Plasmid pGRN121 (SEQ. ID. Nr. 1) stammt. Der Vektor steuert in *E. coli* die Expression von hohen Spiegeln eines Fusionsproteins, das zusammengesetzt ist aus Glutathion-S-Transferase (unterstrichen), einer Spaltsequenz für Thrombin (doppelt unterstrichen), einer Erkennungssequenz für Herzmuskel-Proteinkinase (kursiv), durch Clonierung eingeführte Reste (in Klammern, GSVTK) und dem hTERT-Proteinfragment (in Fettdruck) (SEQ. ID. Nr. 41):

5 MSPILGYWKIKGLVOPTRLLEYLEEKYEEHLYERDEGDKWRNKKFELGLEFP  
NLPYYIDGDVKLTOSMAIRYIADKHNMLGGCPKERAEISMLEGAVLDIRYGV  
10 SRIAYSKDFETLKVDFLSKLPPEMLKMFEDRLCHKTYLNGDHVTHPDEMLYDA  
LDVVLYMDPMCLDAFPKLVCFKKRIEAIPOIDKYLKSSKYIAWPLOGWOATFG  
GGDHPPKSDLVPRGSRRASV[GSVTK]ATSLEGALSGTRHSHPSVGRQHHAGP  
15 PSTSRPPRPWDTPCPPVYAETKHFLYSSGDKEQLRPSFLLSSLRPSLTGARR  
LVETIFLGSRPWMPGTPRRLPRLPQRYWQMRPLFLELLGNHAQCPYGVLL  
KTHCPLRAAVTPAAGVCAREKPQGSVAAPEEEDTDPRRLVQLLRQHSSPW  
QVYGFVRACLRRLVPPGLWGSRHNERRFLRNTKKFISLGKHAKLSLQELT  
20 WKMSVRDCAWLRRSPGVGCVPAAEHRLREEILAKFLHWLMSVYVVELLR  
S

25 Die Abtrennung des rekombinanten Proteins von der Glutathion-S-Transferase-Einheit wird durch ortsgerichtete Proteolyse mittels Thrombin gemäss den Anweisungen des Herstellers erzielt.

pGEX-2TK mit den hTERT-Nucleotiden 782 bis 1636 von pGRN121

30 Zur Herstellung grosser Mengen eines hTERT-Proteinfragments wurde ein weiteres *E. coli*-Expressi-  
onsvektor pGEX-2TK (Pharmacia Biotech, Piscataway N.J.)-Konstrukt hergestellt. Dieses Vektorkon-  
strukt kann zur Herstellung von Fusionsprotein zur Erzeugung polyclonaler und monoclonaler Antikörper  
gegen ein hTERT-Protein verwendet werden. Darüber hinaus kann dieses Fusionsprotein dazu verwendet  
werden, gegen hTERT-Peptide, die in dem Fusionsprotein enthalten sind, gerichtete Antikörper einer Affi-  
nitätsreinigung zu unterwerfen.

35 Dieses Konstrukt enthält eine Insertion, die von den Nucleotiden 782 bis 1636 der hTERT-Insertion im  
Plasmid pGRN121 (SEQ. ID. Nr. 1) stammt. Der Vektor steuert in *E. coli* die Expression von hohen  
Spiegeln eines Fusionsproteins, das zusammengesetzt ist aus Glutathion-S-Transferase (unterstrichen),  
einer Spaltsequenz für Thrombin (doppelt unterstrichen), einer Erkennungssequenz für Herzmuskel-Pro-  
teinkinase (kursiv), durch Clonierung eingeführte Reste (in Klammern, GSVTK) und einem hTERT-Pro-  
teinfragment (in Fettdruck) (SEQ. ID. Nr. 42):

40 MSPILGYWKIKGLVOPTRLLEYLEEKYEEHLYERDEGDKWRNKKFELGLEFPNLPYY  
IDGDVKLTOSMAIRYIADKHNMLGGCPKERAEISMLEGAVLDIRYGVSRIAYSKDFE  
45 TLKVDFLSKLPPEMLKMFEDRLCHKTYLNGDHVTHPDEMLYDALDVVLYMDPMCLDAFP  
KLVCFKKRIEAIPOIDKYLKSSKYIAWPLOGWOATFGGGDHPPKSDLVPRGSRRASV[  
GSVTK]MPRAPRCRAVRSLLSHYREVLPLATFVRRLGPQGWRLVQRGDPAAFRALVAQ  
CLVCVPWDARPPAAPSFRQVSCLKELVARVLQRLCERGAKNVLAFGFALLDGARGGPP  
50 EATTSVRSYLPNTVTDALRGSGAWGLLLRRVGDDLVHLLARCALFVLVAPCAYQVCG  
PPLYQLGAATQARPPPHASGPRRRLGCERAWNHSVREAGVPLGLPAPGARRRGGSASR  
SLPLPKRPRRGAAPEPERTVGQGSWAHPGRTRGPSDRGFCVVSPARPAEEATSL

55 Die Abtrennung des rekombinanten Proteins von der Glutathion-S-Transferase-Einheit wird durch  
ortspezifische Proteolyse mittels Thrombin gemäss den Anleitungen des Herstellers erzielt.

pT7FLhTERT mit hTERT-cDNA, der die 5'-nicht-codierende Sequenz fehlt

60 Wie bereits vorstehend beschrieben, stellt die Erfindung in einer Ausführungsform ein hTERT bereit,  
das zur Erleichterung der Clonierung in bakterielle, Säuger-, Hefe- und Insekten-Expressionsvektoren  
auf ortsgerichtete Weise modifiziert ist und keine 5'-untranslatierte hTERT-Sequenz enthält. Unter man-  
chen Umständen erlaubt die Minimierung der Menge an nicht-Protein-codierender Sequenz die verbes-  
65 serte Proteinherstellung (Ausbeute) und führt zu einer erhöhten mRNA-Stabilität. In dieser erfindungsge-

mässen Ausführungsform wurde vor der Clonierung in dem bakteriellen Expressionsvektor der 5'-nicht-codierende Bereich von hTRT entfernt.

Dies wurde durch Erzeugung einer zusätzlichen Restriktionsschnittstelle unmittelbar stromaufwärts (5') von dem Startcodon (ATG) der hTRT-codierenden Sequenz (Fig. 16) bewirkt. Die Erzeugung einer Restriktionsschnittstelle unmittelbar 5' zum codierenden Bereich des Proteins gestattet die effiziente Herstellung einer grossen Anzahl von Vektoren, die Fusionsproteine codieren, beispielsweise Fusionsproteine, die Markierungen und Peptid-»TAGS« enthalten zum Immunnachweis und zur Reinigung.

In diesem Fall wurde das Oligonucleotid 5'-CCGGCCACCCCCATATGCCGCGCGCTCCC-3', wie oben beschrieben, zur Modifikation der hTRT-cDNA-Nucleotide 779 bis 781 der hTRT-cDNA (Fig. 16) von GCG zu CAT verwendet. Diese 3 Nucleotide sind die letzten Nucleotide vor dem ATG-Startcodon, somit führt diese Änderung nicht zur Modifikation der Proteinsequenz. Die Sequenzänderung führt zur Erzeugung einer einzigen NdeI-Restriktionsstelle in der hTRT-cDNA. Einzelsträngige hTRT-DNA wurde als eine DNA-Quelle für die ortsgerichtete Mutagenese verwendet. Das erhaltene Plasmid wurde zur Bestätigung einer erfolgreichen Mutagenese sequenziert.

Diese Modifikation erlaubte die Konstruktion des nachfolgend beschriebenen erfindungsgemässen Plasmids mit der Bezeichnung pT7FLhTRT. Die ortsspezifisch modifizierte hTRT-Sequenz (Hinzufügung der NdeI-Restriktionsstelle) wurde mit NdeI und NotI gespalten, wobei ein hTRT-Fragment erzeugt wurde. Dieses Fragment wurde danach in ein pSL3418-Plasmid cloniert, das vorher mit NdeI und SmaI (auch ein Restriktionsenzym bei dessen Spaltung glatte Enden entstehen) geschnitten worden war, cloniert. pSL 3418 ist ein modifiziertes pAED4-Plasmid, in das eine FLAG-Sequenz (Immunex Corp. Seattle WA) und eine Enterokinase-Sequenz unmittelbar stromaufwärts von der vorstehend erwähnten NdeI-Stelle inseriert wurden. Dieses Plasmid mit der Bezeichnung pT7FLhTR erlaubt die Expression von hTRT mit vollständiger Länge (mit einem »Flag-Tag« an ihrem 5'-Ende) in einem E. coli Stamm, der T7-RNA-Polymerase exprimiert.

Vektor, in dem eine hTRT-codierende Sequenz durch den MPSV-Promotor gesteuert wird

Die Erfindung stellt auch einen Säuger-Expressionsvektor bereit, in dem hTRT so orientiert ist, dass die hTRT-codierende Sequenz durch den MPSV-Promotor (nachstehend beschrieben) gesteuert wird. Ein EcoRI-Restriktionsfragment von pGRN137, das den hTRT-ORF enthält, wurde in die EcoRI-Stelle von pBBS212 (siehe nachstehend) cloniert, wodurch der 5'-untranslatierte Bereich (5'-UTR) von hTRT entfernt wurde (pGRN137 wurde durch Ausschneiden eines Sall-Sse8387 I-Fragments von pGRN130 (nachstehend beschrieben), das die Kozak-Mutation von hTRT. In den Sall-SSE 83871-Stellen von pGRN136 enthält, konstruiert, wodurch ein Säuger-Expressionsplasmid entsteht, das hTRT (eine »Kozak-Consensus«-Sequenz enthält) von dem MPSV-Promotor exprimiert) (pGRN136 wurde durch Ausschneiden eines HindIII-Sall-Fragments von pGRN126 konstruiert, das den hTRT-ORF enthält und Clonierung in die HindIII-Sall-Stellen von pBBS242. Dadurch entsteht ein Säugerexpressionsplasmid, das hTRT vom MPSV-Promotor exprimiert). Dadurch wurde ein Säuger-Expressionsplasmid mit der Bezeichnung pGRN145 erhalten, das hTRT mit einer »Kozak-Consensus«-Sequenz unter Verwendung des MPSV-Promotors exprimiert. Siehe auch den pGRN152-MPSV-Promotor gesteuerten Säuger-Expressionsvektor, der nachstehend beschrieben wird.

Plasmide mit hTRT-cDNA, der die 3'-nicht-codierende Sequenz fehlt

Wie bereits vorstehend diskutiert, stellt die Erfindung TRTcodierende Nucleinsäuren enthaltende Expressionsvektoren bereit, in denen einige oder alle nicht-codierenden Sequenzen deletiert wurden. Unter manchen Umständen erlaubt die Minimierung der Menge an nicht-Protein-codierender Sequenz die verbesserte Proteinproduktion (Ausbeute) und sie erhöht die mRNA-Stabilität. In dieser erfindungsgemässen Ausführungsform wurde vor der Clonierung in das bakterielle Expressionsplasmid der 3'-nicht-translatierte Bereich von hTRT deletiert.

Das Plasmid pGRN121, das hTRT-cDNA mit vollständiger Länge, wie vorstehend diskutiert, enthält, wurde zuerst hinsichtlich aller APAI-Stellen deletiert. Danach folgte die Deletion des MscI-HincII-hTRT-Restriktionsfragments, das den 3'-UTR enthält. Das NcoI-XbaI-Fragment, das das Stopcodon von hTRT enthält, wurde dann in die NcoI-XbaI-Stelle von pGRN121 inseriert, wobei ein Plasmid mit der Bezeichnung pGRN124 erhalten wurde, das äquivalent zu pGRN121 ist, ausser dass ihm der 3'-UTR fehlt.

Bakterielle Expressionsvektoren mit Antibiotika-Selektionsmarkern

Die Erfindung stellt auch bakterielle Expressionsvektoren bereit, die Selektionsmarker zur Verleihung eines selektierbaren Phänotyps in transformierten Zellen enthält, und Sequenzen, die für die Beibehaltung des Vektors als Episom und Replikation codieren, so dass die Integration in das Wirtsgenom nicht erforderlich ist. Beispielsweise kann der Marker die Biotikaresistenz codieren, beispielsweise Resistenz gegen Chloramphenicol (siehe Harrod, Nucleic Acids Res. 25 (1997), 1720-1726), Kanamycin, G418, Bleomycin und Hygromycin, was die Selektion der Zellen erlaubt, die mit den gewünschten DNA-Se-

quenzen transformiert wurden; siehe beispielsweise Blondelet-Rouault, Gene 190 (1997), 315-317 und Mahan, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92 (1995), 669-673.

In einer erfindungsgemässen Ausführungsform wurde die hTRT mit vollständiger Länge (SEQ. ID. Nr. 1) in einen modifizierten «BlueScript»-Plasmidvektor (Stratagene, San Diego, CA) cloniert, der die Bezeichnung pBBS235 trägt, und in dem ein Resistenzgen für das Antibiotikum Chloramphenicol inseriert worden war. Das NotI-Fragment von pGRN124 (vorstehend diskutiert), das den hTRT-ORF enthält, wurde in die NotI-Stelle von pBBS235 cloniert, so dass der TRT-ORF in der umgekehrten Richtung bezogen auf den lac-Promotor des Vektors vorliegt. Dadurch entsteht ein Plasmid, das für die Mutagenese von Plasmidinsertionen geeignet ist, beispielsweise den erfindungsgemässen TRT-Nucleinsäuren. Dieses Plasmidkonstrukt mit der Bezeichnung pGPN125 wird in den erfindungsgemässen Verfahren verwendet, die Mutagenese von Telomerase-Enzym und TRT-Protein codierenden Sequenzen beinhalten. Es kann auch für die in vitro-Transkription von hTRT mittels des T7-Promotors und die in vitro-Transkription von «antisense»-hTRT mittels des T3-Promotors verwendet werden.

In einer weiteren erfindungsgemässen Ausführungsform wurden die hTRT-ORF enthaltenden NotI-Restriktionsfragmente von pGRN124 in die NotI-Stelle von pBBS235 (nachstehend beschrieben) subcloniert, so dass der TRT-ORF die gleiche Orientierung hat wie der lac-Promotor des Vektors. Dadurch entsteht ein Plasmid mit der Bezeichnung pGRN126, das zur Expression von hTRT mit vollständiger Länge in E. coli verwendet werden kann. Das exprimierte Produkt enthält 29 Aminosäuren, die von dem Vektor pBBS235 codiert werden, woran sich 18 Aminosäuren anschliessen, die von dem 5'-UTR von hTRT codiert werden und danach folgt das hTRT-Protein mit vollständiger Länge.

In einer weiteren erfindungsgemässen Ausführungsform wurde zur Konvertierung des ATG-Initiationscodons von hTRT in einem «Kozak-Consensus»-Sequenz und zur Erzeugung von EcoRI- und BglII-Restriktionsschnittstellen zur Erleichterung der Clonierung in die bakteriellen Expressionsvektoren eine in vitro-Mutagenese von pGRN125 durchgeführt.

Bei dieser Mutagenese-Prozedur wurde das Oligonucleotid

5'-TGCGCACGTGGGAAGCCCTGGCagatctgAatt  
CcaCcATGCCGCGCGCTCCCCGCTG-3'

(SEQ. ID. Nr. 43) verwendet. Dieser neue Expressionsvektor erhielt die Bezeichnung pGRN127.

In einer weiteren erfindungsgemässen Ausführungsform wurde das zweite Asp des TRT-«DD-Motivs» (vorstehend beschrieben) zu einem Alanin umgewandelt, um ein nicht-funktionelles Telomerase-Enzym zu erzeugen und damit ein Mutanten-TRT-Protein zur Verwendung in Experimenten mit dominant/negativen Mutanten. hTRT (SEQ. ID. Nr. 1) wurde in vitro mutagenisiert mit dem Oligonucleotid

5' - CGGGACGGGCTGCTCCTGCGTTTGGTGGAcGcgTTCTTGTTGGTGACACCTCA  
C CTCACC-3'

(SEQ. ID. Nr. 44), um das Asparagin bei dem Rest 869 (Asp869) (von SEQ. ID. Nr. 2) zu einem Alanin (Ala)-Codon umzuwandeln. Dadurch wurde auch eine MluI-Restriktionsschnittstelle erzeugt. Dieses Expressionsplasmid erhielt die Bezeichnung pGRN130 und enthält auch die «Kozak-Consensus»-Sequenz wie für pGRN127 beschrieben.

Die Erfindung stellt auch einen Vektor bereit, der zur Expression eines «antisense»-Sequenzfragments von hTRT entworfen wurde. Das Plasmid pGRN126 wurde mit den Restriktionsenzymen MscI und SmaI vollständig gespalten und erneut ligiert, wobei über 95% des hTRT-ORF in Säugerzellen deletiert wurden. Ein SmaI-MscI-Fragment wurde während dieses Prozesses, um wieder CAT-Aktivität zu erzeugen, erneut inseriert. Dieses ungereinigte Plasmid wurde dann erneut mit Sall und EcoRI geschnitten und das Initiationscodon von hTRT enthaltende Fragment in die Sall-EcoRI-Schnittstellen von pBBS212 (vorstehend beschrieben) inseriert. Dadurch entstand ein «antisense»-Expressionsplasmid, das die «antisense»-Sequenz exprimiert, die den 5'-UTR und 73 Basenpaarreste des hTRT-ORF umspannt. Dieses Plasmid erhielt die Bezeichnung pGRN135.

Expression von hTRT-Telomerase in Hefe

Im folgenden Beispiel wird im Detail die Konstruktion der erfindungsgemässen hTRT-exprimierenden Hefe-Expressionsvektoren zur Produktion grosser Mengen an biologisch aktiver hTRT (SEQ. ID. Nr. 2) mit vollständiger Länge dargestellt. Die Verwendung von biologisch aktiver hTRT in vielen erfindungsgemässen Ausführungen ist vorstehend beschrieben.

Pichia pastoris-Expressionsvektor pPICZ B und hTRT mit vollständiger Länge

Zur Produktion grosser Mengen an biologisch aktivem hTRT wurde der Pichia pastoris-Expressionsvektor pPICZ B (Invitrogen, San Diego, CA) ausgewählt. Die Insertion für die hTRT-codierende Se-

quenz stammte von den Nucleotiden 659 bis 4801 der hTERT-Insertion im Plasmid pGRN121 (SEQ. ID. Nr. 1). Diese Nucleotids quenz enthält die hTERT codierende Sequenz in voller Länge (SEQ. ID. Nr. 2). Dieser Expressionsvektor wurde für die induzierbare Expression von hohen Mengen an unmodifiziertem hTERT-Protein (SEQ. ID. Nr. 2) mit vollständiger Länge in *P. pastoris* entworfen. Die Expression wird von einem Hefepromotor gesteuert, die exprimierte Sequenz verwendet jedoch die hTERT-Initiations- und Terminationscodons. Keine xogenen Codons wurden durch die Clonierung eingeführt. Der erhaltene Vektor PPICZ B/hTERT (Invitrogen, San Diego, CA) wurde zur Transformation d r Hefe verwendet.

#### *Pichia pastoris*-Expressionsvektor hTERT-His6/pPICZ B

Ein zweiter erfindungsgemässer *Pichia pastoris*-Expressionsvektor, der von pPICZ B (Invitrogen, San Diego, CA) abgeleitet war, enthält auch die hTERT codierende Sequenz mit vollständiger Länge (SEQ. ID. Nr. 2), die von den Nucleotiden 659 bis 4801 der hTERT-Insertion im Plasmid pGRN121 (SEQ. ID. Nr. 1) stammt. Dieser Expressionsvektor hTERT-His6/pPICZ B codiert das hTERT-Protein (SEQ. ID. Nr. 2) mit vollständiger Länge und fusioniert mit dem Myc-Epitop- und His6-Reportersequenzen an seinem C-Terminus. Das hTERT-Stopcodon wurde entfernt und durch Vektorsequenzen ersetzt, die das Myc-Epitop und das His6-Reporter-«tag» sowie ein Stopcodon codieren. Dieser Vektor wurde zur Steuerung der induzierbaren Expression des nachfolgenden Fusionsproteins mit hohen Spiegeln in Hefe entworfen, wobei dieses Fusionsprotein aus hTERT-Sequenz (unterstrichen), Vektorsequenzen (in Klammern L und NS-AVD) dem Myc-Epitop (doppelt unterstrichen) und dem His6-«tag» (kursiv) (SEQ. ID. Nr. 45) besteht:

MPRAPRCRAVRSLLRSHYREVLPLATEVRRLLGPOGWRLVORGDPAAAFRALVA  
QCLVCVPWDARPPPAAPSFROVSCLELVARVLORLCERGAKNVLAFGFALL  
DGARGGPPEAFTTSVRSYLPNTVTDALRGSGAWGLLLRRVGDDVLVHLLARC  
ALFVLVAPSCAYOVCGPPLYOLGAATOARPPPHASGPRRRLGCERAWNHSVR  
EAGVPLGLPAPGARRRGGSASRSLPLPKRPRRGAAPEPERTPVGOGSWAHPGR  
TRGPSDRGFCVVSPARPAEEATSLEGALSGTRHSHPSVGROHHAGPPSTSRPPR  
PWDTPCPPVYAETKHFLYSSGDKEOLRPSFLLSSLRPSLTGARRLVETIFLGSRP  
WMPGTPRRLPRLPORYWOMRPLELELLGNHAOCYPGVLLKTHCPLRAAVTPA  
AGVCAREKPOGSVAAPEEEDTDPRRLVOLLROHSSPWVYGFVRACLRRLVP  
PGLWGSRHNERFLRNTKKFISLGKHAKLSLOELTWKMSVRDCAWLRRSPGV  
GCVPAAEHRLREEILAKFLHWLMSVYVVELLRSFFYVTETTFOKNRLFFYRKS  
VWSKLOSIGIROHLKRVOLRELSEAEVROHREARPALLTSRLRFIPKPDGLRPV  
NMDYVVGARTERREKRAERLTSRVKALFSVLNYERARRPGLLGASVLGLDDIH  
RAWRTFVLVRADPPPELYFVKVDVTGAYDTIPODRLTEVIASIKPONTYCV  
RRYAVVOKAAHGHVRKAFKSHVSTLTDLOPYMROFVAHLOETSPLRDVAVVIE  
OSSSLNEASSGLEDFVFLRFMCHHAVRIRGKSYVOCOGIPOGSILSTLLCSLCYGD  
MENKLFAGIRRDGLLLRLVDDFLLVTPHLTHAKTFLRTLVRGVPEYGCVVNLR  
KTVVNFPVEDEALGGTAFVOMPAHGLFPWCGLLLDTRTLEVOSDYSSYARTSI  
RASLTFNRGFKAGRNMRRLKFGVLRLKCHSLFLDLQVNSLOTVCTNIYKILLLO  
  
AYRFHACVLQLPFHOOVWKNPTFFLRVISDTASLCYSILKAKNAGMSLGAKGA  
AGPLPSEAVOWLCHOAFLKLTRHRVTYVPLLGLSLRTAQTOLSRKLPGTTLTA  
LEAAANPALPSDFKTILD[L]EQKLISEEDL[NS.AVD]HHHHHH

#### Expression von hTERT in Insektenzellen

Im folgenden Beispiel ist ausführlich die Konstruktion von hTERT-Telomerase exprimierenden Expressionsvektoren für Insektenzellen zur Herstellung grosser Mengen an biologisch aktivem hTERT mit vollständiger Länge (SEQ. ID. Nr. 2 und SEQ. ID. Nr. 4) beschrieben.

## Baculovirus-Expressionsvektor pVL1393 und hTERT mit vollständiger Länge

Die gewünschte Telomerase codierende Sequenz wurde in den Baculovirus-Expressionsvektor pVL1393 (Invitrogen, San Diego, CA) cloniert. Dieses Konstrukt wurde danach in *Spodoptera frugiperda* (sf-9)-Zellen mit lin arisierter DNA des Autograph California-nucleäre-Polyhedrosis-Virus (Baculogold-AcMNPV) cotransfiziert. Die erhaltenen rekombinanten Baculoviren wurden im Anschluss daran plaquegereinigt und gemäss veröffentlichter Protokolle expandiert.

Dieser Expressionsvektor erlaubt die Expression von hohen Spiegeln an hTERT-Protein mit vollständiger Länge in Insektenzellen. Die Expression wird von einem Baculovirus-Polyhedrin-Genpromotor gesteuert. Keine exogenen Codons wurden durch die Clonierung eingeführt.

## Baculovirus-Expressionsvektor pBlueBacHis2 B und hTERT mit vollständiger Länge

Zur Herstellung grosser Mengen an biologisch aktivem hTERT mit vollständiger Länge (SEQ. ID. Nr. 2) wurde der Baculovirus-Expressionsvektor pBlueBacHis2 B (Invitrogen, San Diego, CA) als eine Quelle für Kontrollelemente ausgewählt. Die hTERT-codierende Insertion bestand aus den Nucleotiden 707 bis 4776 von der hTERT-Insertion im Plasmid pGRN121 (SEQ. ID. Nr. 1), die die hTERT codierende Sequenz mit vollständiger Länge (SEQ. ID. Nr. 2) enthält.

Ein hTERT mit vollständiger Länge mit einem His6- und «anti-Xpress tags» (Invitrogen) wurde ebenfalls konstruiert. Dieser Vektor enthält eine Insertion, die aus den Nucleotiden 707 bis 4776 der hTERT-Insertion von Plasmid pGRN121 (SEQ. ID. Nr. 1) besteht. Dieser Vektor steuert die Expression von hohen Spiegeln an hTERT-Protein mit vollständiger Länge, das an ein spaltbares 6-Histidin und «anti-Xpress tags» fusioniert ist in Insektenzellen. Die Aminosäuresequenz des Fusionsproteins ist nachstehend gezeigt; (-) kennzeichnet eine Spaltstelle für Enterokinase:

```

MPRGSHHHHHHGMASMTGGQQMGRDL YDDDDL-* -DPSSRSAAGTMEFAAAS
TQRCVLLRTWEALAPATPAMPAPRCRAVRSLLRSHYREVLPLATFVRRLGPQ
GWRLVQRGDPAAFRALVAQCLVCVPWDARPPPAAPSFRQVSCLELVARVLQ
RLCERGAKNVLAFGFALLDGARGGPPEAFTTSVRSYLPNTVTDALRGSGAWGL
LLRRVGDDVLVHLLARCAFLVLAAPSCAYQVCGPPLYQLGAATQARPPPHAS
GPRRLGCERAWNHSVREAGVPLGLPAPGARRRGGSASRSLPLPKRPRRGAAP
EPERTPVGQGSWAHPGRTRGPSDRGFCVVSAPARPAEEATSLEGALSGTRHSHPS
VGRQHHAGPPSTSRPPRPWDTPCPPVYAETKHFLYSSGDKEQLRPSFLLSSLRP
SLTGARRLVETIFLGSRPWMPGTPRRLPRLPQRYWQMRPLFLELLGNHAQCPY
GVLLKTHCPLRAAVTPAAGVCAREKPQGSVAAPPEEDTDPRRLVQLLRQHSSP
WQVYGFVRACLRRLVPPGLWGSRHNERFLRNTKKFISLGKHAKLSLQELTW
KMSVRDCAWLRSPGVGCVPAAEHRLREEILAKFLHWLMSVYVVELLSFFY
VTETTFQKNRLFFYRKS VWSKLQSIGIRQHLKRVQLRELSEAEVRQHREARPA
LTSRLRFIPKPDGLRPIVNMDYVVGARTFRREKRAERLTSRVKALFSVLNYERA
RRPGLLGASVLGLDDIHRAWRTFVLRVRAQDPPPELYFVKVDVTGAYDTIPQD
RLTEVIASIIKPQNTYCVRRYAVVQKAAHGHVRKAFKSHVSTLTDLQPYMRQF
VAHLQETSPLRDAVVIEQSSSLNEASSGLFDVFLRFMCHHAVRIRGKSYVQCQ
GIPQGSILSTLLCSLCYGD MENKLFAGIRRDGLLLRLVDDFLLVTPHLTHAKTFL
RTLVRGVPEYGCVVNLKRTVNVFPVEDEALGGTAFVQMPAHGLFPWCGLLLD
TRTLEVQSDYSSYARTSIRASLTFNRGFKAGRNMRRKLFGLRLKCHSLFLDLQ
VNSLQTVCTNIYKILLQAYRFHACVLQLPFHQVWKNPTFFLRVISDTASLCY
SILKAKNAGMSLGAKGAAGPLPSEAVQWLCHQAFLLKLTRHRVTYVPLLGS
L
RTAQTQLSRKLP GTTLTALEAAANPALPSDFKTILD

```

## Baculovirus-Expressionsvektor pBlueBac4.5 und hTERT-Protein mit vollständiger Länge

Zur Herstellung grosser Mengen an biologisch aktiven hTERT mit vollständiger Länge (SEQ. ID. Nr. 2) wurde ein zweiter Baculovirus-Expressionsvektor, pBlueBac4.5 (Invitrogen, San Diego, CA), konstruiert. Die hTERT-codierende Insertion bestand aus den Nucleotiden 707 bis 4776 von der hTERT vom Plasmid



pGRN121 (SEQ. ID. Nr. 1) Diese Nucleotidsequenz enthält die hTRT-codierende Sequenz mit vollständiger Länge (SEQ. ID. Nr. 2).

Baculovirus-Expressionsvektor pMelBacB und hTRT-Protein mit vollständiger Länge

Zur Herstellung grosser Mengen an biologisch aktivem hTRT mit vollständiger Länge (SEQ. ID. Nr. 2) wurde ein dritter Baculovirus-Expressionsvektor pMelBacB (Invitrogen, San Diego, CA), konstruiert. Die hTRT-codierende Insertion besteht auch aus den Nucleotiden 707 bis 4776 von der hTRT-Insertion vom Plasmid pGRN121 (SEQ. ID. Nr. 1). Diese Nucleotidsequenz enthält die hTRT codierende Sequenz mit vollständiger Länge (SEQ. ID. Nr. 2).

pMelBacB steuert die Expression von hTRT mit vollständiger Länge (SEQ. ID. Nr. 2) in Insektenzellen in das extrazelluläre Medium über den sekretorischen Stoffwechselweg unter der Verwendung der Melittin-Signalsequenz. Somit werden hohe Spiegel an hTRT mit vollständiger Länge (SEQ. ID. Nr. 2) sezerniert. Die Melittin-Signalsequenz wird nach Ausscheidung gespalten, ist jedoch ein Teil des Proteinpools, der intrazellulär verbleibt. Aus diesem Grund ist sie in der folgenden Sequenz in Klammern angegeben. Die von dem Vektor codierte Sequenz des Fusionsproteins (SEQ. ID. Nr. 38) ist nachstehend gezeigt:

```
(MKFLVNVALVFMVVYISYIYA)-*-DPSSRSAAGTMEFAAASTQRCVLLRTWEA
LAPATPAMPRAPRCRAVRSLRSHYREVLPLATFVRRLGPQGWRLVQRGDP
AFRALVAQCLVCVPWDARPPPAAPSFQVSCLELVARVLQRLCERGAKNVL
AFGFALLDGARGGPPEAFTTSVRSYLPNTVTDALRGSGAWGLLLRRVGDDVL
VHLLARCALFVLVAPSCAYQVCGPPLYQLGAATQARPPPHASGPRRRLGCERA
WNHSVREAGVPLGLPAPGARRRGGSASRSLPLPKRPRRGAAPERTPVGQGS
WAHPGRTRGPSDRGFCVVPARPAEEATSLEGALSGTRHSHPSVGRQHHAGPP
STSRPPRPWDTPCPPVYAETKHFYSSGDKEQLRPSFLLSSLRPSLTGARRLVET
IFLGSRPWMPGTTPRRLPRLPQRYWQMRPLFLELLGNHAQCPYGVLLKTHCPLR
AAVTPAAGVVCAREKPPQGSVAAPPEEDTDPRRLVQLLRQHSSPWQVYGFVRAC
LRRLVPPGLWGSRHNERFLRNTKKFISLGKHAKLSLQELTWKMSVRDCAWL
RRSPGVGCVPAAEHRLREEILAKFLHWLMSVYVVELLSFFYVTETTFQKNRL
FFYRKS VWSKLQSIGIRQHLKRVQLRELSEAEVRQHREARPALLTSRLRFIPKPD
GLRPVNM DYVVGARTFRREKRAERLTSRVKALFSVLNYERARRPGLLGASVL
GLDDIHRAWRTFVLRVRAQDPPPELYFVKVDVTGAYDTIPQDRLTEVIASIIKP
QNTYCVRRYA VVQKAAHGHVRKAFKSHVSTLTDLQPYMRQFVAHLQETSPLR
DAVVIEQSSSLNEASSGLFDVFLRFMCHHAVRIRGKSYVQCQGPQGSILSTLLC
SLCYGDMENKLFAGIRRDGILLRLVDDFLLVTPHLTHAKTFLRTLVRGVPEY'G
CVVNLRKTVVNFVEDEALGGTAFVQMPAHGLFPWCGLLLDTRTLEVQSDYS
SYARTSIRASLTFNRGFKAGRNMRKLFGLVRLKCHSLFLDLQVNSLQTVCTNI
YKILLQAYRFHACVLQLPFHQVWKNPTFFLRVISDTASLCYSILKAKNAGMS
LGAKGAAGPLPSEAVQWLCHQAFLLKLTRHRVTYVPLLGLSLRTAQTQLSRKL?
GTTTLTALEAAANPALPSDFKTILD
```

Expression von hTRT in Säugerzellen

Die erfindungsgemässe rekombinante hTRT kann in grossen Mengen als biologisch aktive hTRT mit vollständiger Länge (SEQ. ID. Nr. 2) in einer Vielzahl von Säuger-Zelllinien hergestellt werden. Diese biologisch aktive, in Säugern hergestellte hTRT ist in vielen erfindungsgemässen Ausführungsformen, wie vorstehend diskutiert, von Nutzen.

MPSV-hTRT-Expressionsplasmide

Die Erfindung stellt auch ein Expressionssystem für die Verwendung in Säugerzellen zur Verfügung, das die höchstmögliche Expression eines rekombinanten Proteins, wie beispielsweise Telomerase, bereitstellt, ohne dass dabei die codierende Sequenz modifiziert werden muss (beispielsweise durch Optimierung der Codonverwendung). In einer Ausführungsform stellt die Erfindung ein MPSV-Säuger-Ex-

pressionssysteme bereit, das die erfindungsgemässen TRTs von Plasmid pBBS212 exprimieren kann, beschrieben als pMPSV-TM in Lin J.H., Gene 47 (1994), 287-292. Die MPSV-Plasmide können entweder als stabile oder transiente Clone exprimiert werden.

In diesem Expressionssystem werden exogene Kontrollelemente für die Transkription in den Vektor eingebaut, während die hTRT codierende Sequenz (SEQ. ID. Nr. 1) selbst unverändert bleibt. Der durch den Cytomegalovirus (CMV)-Enhancer verstärkte «myeloproliferative Sarkomall-Virus (MPSV) LTR (MPSVLTR) -Promotor wird für die Initiation der Transkription eingebaut. Dieser Promotor zeigt durchwegs höhere Expressionsspiegel in Zelllinien (siehe Lin, J.H (1994) a.a.O.). Eine «Kozak-Consensus»-Sequenz kann für die Initiation der Translation eingebaut werden (siehe Kozak, Mamm. Genome 7 (1996), 563-574). Alle extra vorliegenden nicht-translatierten 5'- und 3'-hTRT-Sequenzen können entfernt werden, um so sicherzustellen, dass diese Sequenzen die Expression nicht stören, wie bereits vorstehend diskutiert. Das die vollständige hTRT codierende Sequenz enthaltende MPSV-Plasmid, das alle extra-Sequenzen enthält, trägt die Bezeichnung pGRN133. Ein Kontroll-hTRT-«antisense»-Plasmid wurde ebenfalls konstruiert. Dieser Vektor, ist identisch mit pGRN133, ausser dass die TRT-Insertion die «antisense»-Sequenz von hTRT SEQ. ID. Nr. 1 ist (dieser «antisense»-Kontrollvektor trägt die Bezeichnung pGRN134). Das MPSV-Plasmid, das die vollständige hTRT-codierende Sequenz enthält, bei dem jedoch alle extra-Sequenzen entfernt wurden, und das die «Kozak-Consensus»-Sequenz enthält, trägt die Bezeichnung pGRN155.

Zwei Selektionsmarker, PAC (Puromycin-N-acetyl-Transferase = Puromycin-Resistenz) und HygB (Hygromycin B = Hygromycin-Resistenz) sind für die Selektion der Plasmide nach Transfektion vorhanden (siehe die vorstehende Diskussion, die sich auf selektierbare Marker bezieht). Doppelselektion unter Verwendung von Markern auf beiden Seiten des Vektor-Polylinkers sollte die Stabilität der hTRT codierenden Sequenz erhöhen. Eine DHFR (Dihydrofolat-Reduktase) codierende Sequenz wird eingebaut, um die Amplifikation der Expressionskassette nach der Erzeugung stabiler Clone zu erlauben. Weitere Massnahmen zur Genamplifikation können ebenfalls zur Steigerung der Ausbeuten an rekombinanten Proteinen verwendet werden.

Die Erfindung stellt auch MPSV-Säuger-Expressionsplasmide bereit, die hTRT-Fusionsproteine enthalten. In einer Ausführungsform ist die hTRT-Sequenz, die ihren 5'-nicht-translatierten Bereich beibehalten hat, mit einem Epitop-«flag» verknüpft, beispielsweise im IBI FLAG (Intranational Biotechnologies Inc. (IBI) Kodak, New Haven, CT) und in das MPSV-Expressionsplasmid inseriert (mit der Bezeichnung pGRN147). Dieses spezielle Konstrukt enthält eine «Kozak»-Initiationsstelle für die Translation. Das exprimierte Fusionsprotein kann unter Verwendung des monoclonalen Antikörpers M-1 anti-FLAG-Octapeptid (IBI, Kodak, a.a.O.) gereinigt werden.

In einer weiteren Ausführungsform ist hTRT ortsspezifisch verändert. Ein Aminosäurerest-Codon ist mutagenisiert, wobei Asparaginsäure an Position 869 (SEQ. ID. Nr. 1) in ein Alanin überführt wurde. Diese Asp869→Ala-hTRT-Mutante, die ihren 5'-nicht-translatierten Bereich beibehalten hat, und in die eine «Kozak»-Sequenz eingebaut worden war, wurde in ein MPSV-Expressionsplasmid inseriert und erhielt die Bezeichnung pGRN146. Die Asp869→Ala-hTRT-Mutanten, wurde so weiter modifiziert, dass sie FLAG-Sequenz, wie vorstehend beschrieben, enthielt, und die clonierte Insertion wurde in ein MPSV-Expressionsplasmid inseriert. Dieses Expressionsplasmid wurde mit pGRN154 bezeichnet. Insbesondere wird für pGRN154 ein Eam1105I-Restriktionsfragment von pGRN146, das die «Kozak»-Sequenz enthielt, die wiederum das «front end» (5'-Segment) von hTRT enthielt, in die Eam1105I-Stellen von pGRN147 (siehe vorstehend) cloniert, um so ein MPSV-Expressionsplasmid zu konstruieren, das hTRT zusammen mit einer «Kozak»-Sequenz und der vorstehend beschriebenen D869→A-Mutation und das «IBI-flag» exprimieren kann.

Eine weitere erfindungsgemässe Ausführungsform stellt ein weiteres Expressionsplasmid bereit, das von pGRN146 stammt. Das Säuger-Expressionsplasmid mit der Bezeichnung pGRN152 wurde durch Ausschneiden des EcoRI-Fragments von Plasmid pGRN146 (das den hTRT-ORF enthält) erzeugt und zur Entfernung des 5'-UTR von hTRT in die EcoRI-Stelle von pBBS212 cloniert. Die hTRT ist so orientiert, dass deren Expression durch den MPSV-Promotor kontrolliert wird. Dadurch entsteht ein Säuger-Expressionsplasmid, das hTRT zusammen mit einer «Kozak-Consensus»-Sequenz und der D869→A-Mutation unter Verwendung des MPSV-Promotors exprimiert.

#### Expression von hTRT in 293-Zellen mittels des episomalen Vektors pEBVHis

Der episomale Vektor, pEBVHis (Invitrogen, San Diego, CA) wurde so modifiziert, dass er ein hTRT (SEQ. ID. Nr. 2)-Fusionsprotein exprimiert, das hTRT mit einem Epitop-«tag» einer N-terminalen Verlängerung das «Xpress»-Epitap (Invitrogen, San Diego, CA) umfasst, exprimiert (mit der Bezeichnung pGRN122). Das NotI-hTRT-Fragment von pGRN121, das den offenen Leserahmen (ORF) von hTRT enthält, wurde in die NotI-Stelle von pEBVHisA cloniert, so dass der hTRT-ORF in der gleichen Orientierung ist wie der Rous Sarkom-Virus (RSV)-Promotor des Vektors. In dieser Orientierung war das «His6 flag» verhältnismässig näher am N-Terminus der hTRT.

Es wurde auch ein Kontrollvektor konstruiert, der als Insertion die «antisense»-Sequenz von hTRT enthielt und das Epitop-«tag» (das Kontrollplasmid wurde mit pGRN123 bezeichnet). Der Vektor wurde in 293-Zellen transfiziert und die translatierte hTRT identifiziert und mittels eines für das «Xpress»-Epi-

top spezifischen Antikörpers isoliert. pEBVHis ist ein Hygromycin resistenter episomaler EBV-Vektor, der das gewünschte Protein fusioniert an ein N-terminales Peptid exprimiert. Die den Vektor tragenden Zellen werden selektiert und expandiert und danach werden nucleäre und cytoplasmatische Extrakte präpariert. Diese sowohl Kontrollextrakte werden mit anti-Xpress-Antikörper immunpräzipitiert und die immunpräzipitierten Kügelchen werden mittels eines typischen Assays auf T-terminale Aktivität getestet.

#### Expression rekombinanter hTERT in sterblichen normalen diploiden menschlichen Zellen

In einer erfindungsgemässen Ausführungsform können rekombinante hTERT und notwendige Telomerase-Enzymkomplex-Bestandteile in normalen diploiden sterblichen Zellen exprimiert werden, um so deren direkte Immortalisierung zu erreichen oder deren Immortalisierung zu erleichtern. Dies würde einem erlauben, diploide unsterbliche Zellen zu erhalten, mit einem ansonsten normalen Phänotyp und Karyotyp. Wie bereits vorstehend diskutiert, hat diese Verwendung von Telomerase eine enorme kommerzielle Bedeutung.

«Sense»-hTERT (Fig. 16) und «antisense»-hTERT (SEQ. ID. Nr. 45) wurden in einem CMV-Vektor cloniert. Diese Vektoren wurden gereinigt und in zwei Clone von normalen sterblichen diploiden menschlichen Zellen transfiziert. Die menschlichen Clone waren die frisch passagierten diploiden menschlichen Zellstämme BJ und IMR90.

Die Analyse von Telomerase-Aktivität mittels eines TRAP-Assays (mittels des «TRAPEze» Kit (Oncor, Inc., Gaithersburg, MD)) ergab, dass bei Transfektion mit «sense»-hTERT sowohl in dem Zellstamm BJ als auch IMR90 Telomerase-Aktivität erzeugt wurde, jedoch nicht bei Transfektion mit «antisense»-hTERT.

#### Expression rekombinanter hTERT in immortalisierten menschlichen IMR90-Zellen

Unter Verwendung des gleichen hTERT-«sense»-Konstrukts, das in die CMV-Vektoren cloniert war, die bei den vorstehend beschriebenen Studien mit diploiden menschlichen BJ- und IMR90-Zellstämmen verwendet wurden, wurde die immortalisierte SW13 ALT-«pathway»-Zelllinie (eine mit SV40-Antigen immortalisierte IMR90-Zelle) transient transfiziert. Mittels eines TRAP-Assays (TRAPEze, Oncor, Inc., Gaithersburg, MD) konnte gezeigt werden, dass Telomerase-Aktivität mit dem «sense»-Konstrukt in transfizierten Zellen erzeugt wurde.

#### Vektoren für die regulierte Expression von hTERT in Säugerzellen: Induzierbare und reprimierbare Expression von hTERT

Die Erfindung stellt Vektoren bereit, die manipuliert werden können, um so die Expression der erfindungsgemässen TRTs, beispielsweise hTERT, induzieren oder reprimieren zu können. Beispielsweise wurde hTERT (SEQ. ID. Nr.1) in das Ecdyson-induzierbare Expressionssystem von Invitrogen (San Diego, CA) und die «Tet-On- and Tet-Off»-Tetracyclin-regulierten Systeme von Clontech Laboratories, Inc. (Palo Alto, CA) cloniert. Solche induzierbaren Expressionssysteme werden für solche erfindungsgemässen Verfahren bereitgestellt, bei denen es wichtig ist, den Spiegel oder die Rate der Transkription von transfizierter TRT kontrollieren zu können. Beispielsweise stellt die Erfindung Zelllinien bereit, die mittels der Expression von hTERT immortalisiert sind. Solche Zellen können durch Hemmung der hTERT-Expression durch den Vektor mittels dessen Kontrollelementen für die Transkription, beispielsweise dem «Tet-Off»-System «sterblich» gemacht werden. Die Erfindung stellt auch Verfahren bereit, bei denen TRT lediglich transient exprimiert wird, um so die konstitutive Expression von hTERT zu vermeiden, was zu einer unerwünschten «Immortalisierung» der transfizierten Zellen, wie bereits vorstehend diskutiert, führen könnte.

Das Ecdyson-induzierbare Säuger-Expressionssystem wurde hinsichtlich der Möglichkeit der regulierten Expression des gewünschten Gens in Säugerzellen entworfen. Das System ist durch seinen fest regulierten Mechanismus gekennzeichnet, der in Säugerzellen praktisch keine Basaltranskription gestattet und eine mehr als 200fache Induzierbarkeit aufweist. Das Expressionssystem basiert auf dem heterodimären Ecdyson-Rezeptor von Drosophila. Bei dem Ecdyson-induzierbaren Expressionssystem wird ein Analoges des Steroidhormons Ecdyson, Muristeron A zur Aktivierung der Expression von hTERT über einen heterodimären nucleären Rezeptor verwendet. Es wurde von Expressionsspiegeln berichtet, die mehr als 200fach über den Basisspiegeln lagen, wobei keine Auswirkung auf die Physiologie der Säugerzelle auftrat (No, «Ecdysone-Inducible Gene Expression in Mammalian Cells and Transgenic Mice», Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93 (1996), 3346–3351). Nach Bindung von Ecdyson oder Muristeron, einem Analogen von Ecdyson, aktiviert der Rezeptor einen auf Ecdyson ansprechenden Promotor, was zur kontrollierten Expression des gewünschten Gens führt. In dem Ecdyson-induzierbaren Säuger-Expressionssystem werden beide Monomere des heterodimären Rezeptors konstitutiv von demselben Vektor pV-gRXR exprimiert. Der auf Ecdyson ansprechende Promotor, der letztlich die Expression des gewünschten Gens steuert, ist auf einem zweiten Vektor pIND lokalisiert, der die Transkription des gewünschten Gens steuert.

hTERT wird in den Vektor pIND (Clontech Laboratories, Inc., Palo Alto, CA) cloniert, der 5 modifizier-

te auf Ecdyson ansprechende Elemente (E/GREs) stromaufwärts eines minimalen Hitzeschock-Promotors enthält und die Mehrfach-Clonierungsstelle. Mit diesem Konstrukt werden danach Z linien transfiziert, die vorher so verändert wurden, dass sie den Ecdyson-Rezeptor stabil exprimieren. Nach der Transfektion werden die Zellen zur Induktion intrazellulärer Expression von pIND mit Muristeron A behandelt.

Die «Tet-on and Tet-off»-Expressionssysteme (Clontech, Palo Alto, CA) erlauben den Zugang zu den regulierten Gen-Expressionssystemen mit einer Expression auf hohem Niveau, die von Gossen «Tight control of gene expression in mammalian cells by tetracycline responsive promoters», Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89 (1992), 5547–5551, hinsichtlich des «Tet-Off»-Transkriptions-Repressionssystems beschrieben wurden, siehe auch Gossen, «Transcriptional activation by tetracycline in mammalian cells», Science 268 (1995), 1766–1769 hinsichtlich des «Tet-On»-induzierbaren Transkriptionssystems. In «Tet-Off»-transformierten Zelllinien wird die Genexpression angeschaltet, wenn Tetracyclin (Tc) oder Doxycyclin («Dox», ein Tc-Derivat) von dem Kulturmedium entfernt werden. Im Gegensatz dazu wird in «Tet-On»-Zelllinien die Expression durch die Zugabe von Tc oder «Dox» zu dem Medium angeschaltet. Beide Systeme erlauben die festregulierte Expression clonierter Gene als Antwort auf unterschiedliche Konzentrationen von Tc oder «Dox».

Bei diesem System wird «pTRE» als ein «Antwort»-Plasmid verwendet, das zur Expression eines gewünschten Gens verwendet werden kann. pTRE enthält eine Mehrfachclonierungsstelle (MCS) unmittelbar stromabwärts des auf Tet ansprechenden PhCMV\*-1-Promotors. Gewünschte cDNAs oder Gene, die in eine der Stellen in der MCS inseriert wurden, sprechen auf die regulatorischen Proteine tTA und rTA in den «Tet-Off»- bzw. «Tet-On»-Systemen an. PhCMV\*-1 enthält das auf Tet ansprechende Element (TRE), das aus sieben Kopien der tet-Operatorsequenz mit 42-bp (teto) besteht. Das TRE-Element ist unmittelbar stromaufwärts des minimalen CMV-Promotors (PminCMV), dem der Enhancer fehlt, der Teil des vollständigen CMV-Promotors in den pTet-Plasmiden ist. Als Konsequenz ist PhCMV\*-1 bei einem Fehlen der Bindung von regulatorischen Proteinen an die tetO-Sequenzen abgeschaltet. Die clonierte Insertion muss ein Initiationscodon besitzen. In einigen Fällen kann die Zugabe einer «Kozak-Consensus»-Ribosomenbindungsstelle die Expressionsspiegel verbessern. Es wurden jedoch viele cDNAs in Tet-Systemen effizient exprimiert ohne die Zugabe einer «Kozak»-Sequenz. «pTRE-Gen X»-Plasmide werden mit pTK-Hyg cotransfiziert, was die Selektion stabiler Transfektanten erlaubt.

Die Etablierung eines «Tet-Off»- oder «Tet-On»-Expressionssystems erfordert im allgemeinen zwei aufeinanderfolgende stabile Transfektionen, um so eine «doppelstabile» Zelllinie zu erzeugen, die integrierte Kopien von Genen enthält, die das geeignete regulatorische Protein und TRT unter der Kontrolle eines auf tet ansprechenden Elements (TRE) enthalten. Bei der ersten Transfektion wird ein geeignetes regulatorisches Protein in die Zelllinie der Wahl durch Transfektion eines «Regulator-Plasmids», beispielsweise eines «pTet-Off»- oder «pTet-On»-Vektors, das die geeigneten regulatorischen Proteine exprimiert, eingeführt. Die in das in das pTRE «Antwortplasmid» clonierte hTRT wird danach in der zweiten Transfektion eingeführt, um so die doppelstabile «Tet-Off»- oder «Tet-On»-Zelllinie zu erzeugen. Beide Systeme ergeben eine sehr genaue ein/aus-Kontrolle der Genexpression, eine regulierte dosisabhängige Induktion und hohe absolute Spiegel der Genexpression.

#### Expression rekombinanter hTRT mittels DHFR und Adenovirus-Sequenzen

Das pGRN155-Plasmidkonstrukt wurde für die transiente Expression von hTRT-cDNA in Säugerzellen entworfen. Eine «Kozak-Consensus»-Sequenz wird an dem 5'-Ende der hTRT-Sequenz inseriert. Die hTRT-Insertion enthält keine 3'- oder 5'-nicht-translatierten Sequenzen (UTR). Die hTRT-cDNA wird in die EcoRI-Stelle von p91023(B) inseriert (Wong, Science 228 (1985), 810–815). Die hTRT-Insertion befindet sich in derselben Orientierung wie der offene Leserahmen (ORF) von DHFR. Dadurch ist der Expressionsvektor für eine transiente Expression von besonderem Nutzen.

pGRN15 enthält den SV40-Replikationsstartpunkt und -Enhancer unmittelbar stromaufwärts eines Adenovirus-Promotors, ein Gen für Tetracyclinresistenz, einen E. coli-Replikationsstartpunkt und einen VAI- und VAII-Genbereich von Adenovirus. Diese Expressionskassette enthält in der folgenden Reihenfolge: den späten Hauptpromotor von Adenovirus; den dreiseitigen Leader von Adenovirus; ein Hybridintron, das aus einer 5'-Spleissstelle vom ersten Exon des dreiseitigen Leaders und einer 3'-Spleissstelle des Immunglobulins der Maus besteht; die hTRT-cDNA; die Maus-DHFR-codierende Sequenz und das SV40-Polyadenylierungssignal.

Jetzt wurde beschrieben, dass der dreiseitige Leader von Adenovirus und die VA-RNAs die Effizienz, mit der polycistronische mRNAs translatiert werden, erhöht. Es wurde auch berichtet, dass die DHFR-Sequenz die Stabilität von Hybrid-mRNA verstärkt. Die DHFR-Sequenz kann auch einen Marker zur Selektion und Amplifikation von Vektorsequenzen liefern (siehe Logan, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81 (1984) 3655; Kaufman, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82 (1985), 689 und Kaufman (1988) persönliche Mitteilung, Focus (Life Technologies, Inc.), Bd. 10 Nr. 3).

Für Zwecke der Veranschaulichung wird die folgende Liste von Expressionsplasmiden bereitgestellt.

## pGRN121

Das EcoRI-Fragment des lambda-Clons 25-1.1.6, das die gesamte das hTRT-Protein codierende cDNA enthält, inseriert in die EcoRI-Stelle von pBluescriptII SK+, so dass das 5'-Ende der cDNA in der Nähe des T7-Promotors im Vektor ist. Der in diesem Vektor verwendete selektierbare Marker ist Ampicillin.

## pGRN122

Das NotI-Fragment von pGRN121, das die den hTRT-ORF (offenen Leserahmen) codierende Sequenz enthält, inseriert in die NotI-Stelle von pEBVHisA, so dass die codierende Sequenz mit dem RSV-Promotor funktionell verknüpft ist. Dieses Plasmid exprimiert ein Fusionsprotein, das aus einem mit dem N-Terminus des hTRT-Proteins fusionierten «His6-flag» zusammengesetzt ist. Der verwendbare Marker, der mit diesem Vektor verwendet wird, ist Ampicillin oder Hygromycin.

## pGRN123

Das NotI-Fragment von pGRN121, das die den hTRT-ORF (offener Leserahmen) codierende Sequenz enthält, inseriert in die NotI-Stelle von pEBVHisA, so dass die codierende Sequenz im Vergleich zu dem RSV-Promotor in der entgegengesetzten Richtung orientiert ist, so dass «antisense»-hTRT exprimiert wird.

## pGRN124

Alle APAI-Stellen in pGRN121 deletiert und danach erfolgte die Deletion des den 3'-UTR («untranslatierten Bereich») enthaltenden MscI-HincII-Fragments. Das das Stopcodon der hTRT codierenden Sequenz enthaltende Nco-XbaI-Fragment wurde danach in die Nco-XbaI-Stellen von pGRN121 inseriert, wodurch ein Plasmid entstand, das äquivalent zu pGRN121 ist, ausser dass ihm der 3'-UTR fehlt. Dieses Plasmid kann vorzugsweise für gesteigerte Expressionsspiegel in einigen Zellen verwendet werden.

## pGRN125

Das die hTRT codierende Sequenz enthaltende NotI-Fragment von pGRN124 inseriert in die NotI-Stelle von pBBS235, so dass der offene Leserahmen im Vergleich zu dem lac-Promotor in der gegenläufigen Orientierung ist. Der nachweisbare Marker, der mit diesem Vektor verwendet wird, ist Chloramphenicol.

## pGRN126

Das die hTRT codierende Sequenz enthaltende NotI-Fragment von pGRN124, inseriert in die NotI-Stelle von pBBS235, so dass die hTRT codierende Sequenz in der gleichen Orientierung wie der lac-Promotor inseriert ist.

## pGRN127

Das Oligonucleotid

5' - TGCGCACGTGGGAAGCCCTGGCagatctgAattCCaCcA

TGCCGCGCGCTCCCCGC

TG-3'

wurde für die in vitro-Mutagenese von pGRN125 zur Umwandlung des Initiationscodons ATG der hTRT codierenden Sequenz in eine «Kozak-Consensus»-Sequenz verwendet und zur Erzeugung von EcoRI- und BglII-Stellen für die Clonierung. COD2866 wurde auch zur Umwandlung von AmpS zu AmpR (Ampicillin-Resistenz) verwendet und COD1941 wurde zur Umwandlung von CatR (Chloramphenicol-Resistenz, zu CatS (Chloramphenicol-Empfindlichkeit) umgewandelt.

## pGRN128

Das Oligonucleotid

5' -

TGCGCACGTGGGAAGCCCTGGCagatctgAattCCaCcATGCCGCGCGCTCCCCGC

TG-3'

wurde für die in vitro-Mutagenese verwendet, um so das Initiationscodon ATG von hTRT in inem «Kozak-Consensus»-Sequenz umzuwandeln und EcoRI und BglII-Stellen für die Clonierung zu erzeugen. Es wurde auch das Oligonucleotid

5' -  
 5 CTGCCCTCAGACTTCAAGACCATCCTGGACTACAAGGACGACGATGACAAA  
 TGAATTCAGATCTGCGGCCGCCACCGCGGTGGAGCTCCAGC-3'

10 zur Insertion des «IBI Flag» (International Biotechnologies Inc. (IBI) Kodak, New Haven, CT) am C-Terminus verwendet und zur Erzeugung von EcoRI- und BglII-Stellen für die Clonierung. COD2866 wurde auch zur Umwandlung von AmpS zu AmpR verwendet und COD1941 zur Umwandlung von CatR zu CatS.

pGRN129

15 Das Oligonucleotid  
 5' -  
 CGGGACGGGCTGCTCCTGCGTTTGGTGGAcGcgTTCTTGTTGGTGACACCTCA  
 20 CCTCACC-3'

wurde zur in vitro-Mutagenese zur Umwandlung von Asp869 in ein Ala-Codon verwendet (d.h. das zweite Asp des DD-Motivs wurde für dominant/negative Experimente in ein Alanin umgewandelt). Dadurch wurde auch eine MluI-Stelle erzeugt. Auch das Oligonucleotid

25 5' -  
 CTGCCCTCAGACTTCAAGACCATCCTGGACTACAAGGACGACGATGACAAA  
 TGAATTCAGATCTGCGGCCGCCACCGCGGTGGAGCTCCAGC-3'

30 wurde zur Insertion des «IBI Flag» (IBI, New Haven, CT) am C-Terminus verwendet und zur Erzeugung von EcoRI- und BglII-Stellen für die Clonierung. Auch COD2866 wurde zur Umwandlung von AmpS zu AmpR verwendet und COD1941 zur Umwandlung von CatR zu CatS.

pGRN130

35 Das Oligonucleotid  
 5' -  
 CGGGACGGGCTGCTCCTGCGTTTGGTGGAcGcgTTCTTGTTGGTGACACCTCA  
 40 CCTCACC-3'

wurde bei einer in vitro-Mutagenese zur Umwandlung des Asp869-Codons in ein Ala-Codon verwendet (d.h. das zweite Asp des DD-Motivs wurde zur Erzeugung einer dominant/negativen Proteinvariante in ein Alanin umgewandelt). Dadurch wurde auch eine MluI-Stelle erzeugt. Auch das Oligonucleotid

45 5' -  
 TGCGCACGTGGGAAGCCCTGGCagatctgAattCCaCcATGCCGCGCGCTCCCCGC  
 TG-3'

50 wurde bei einer in vitro-Mutagenese zur Umwandlung des Initiationscodons ATG der hTRT-codierenden Sequenz in eine «Kozak-Consensus»-Sequenz verwendet und zur Erzeugung von EcoRI und BglII-Stellen für die Clonierung. Auch COD2866 wurde zur Umwandlung von AmpS zu AmpR (Ampicillin-Resistenz) verwendet und COD1941 zur Umwandlung von CatR (Chloramphenicol-Resistenz) zu CatS (Chloramphenicol-Empfindlichkeit).

55 pGRN131

Das EcoRI-Fragment von pGRN128, das die hTRT-ORF mit einer «Kozak»-Sequenz und «IBI Flag» (IBI, New Haven, CT)-Mutationen enthält, inseriert in die EcoRI-Stelle von pBBS212, so dass der hTRT-ORF von dem MPSV-Promotor exprimiert wird.

pGRN132

65 Das EcoRI-Fragment von pGRN128, das den hTRT-ORF mit einer «Kozak»-Sequenz und «IBI Flag»

(IBI, New Haven, CT)-Mutationen enthält, inseriert in die EcoRI-Stelle von pBBS212, so dass die «antisense»-Sequenz des hTRT-ORF vom MPSV-Promotor xprimiert wird.

#### pGRN133

5 Das EcoRI-Fragment von pGRN121, das die hTRT-codierende Sequenz enthält, inseriert in die EcoRI-Stelle von pBBS212, so dass das hTRT-Protein unter der Kontrolle des MPSV-Promotors expriert wird.

#### 10 pGRN134

Das EcoRI-Fragment von pGRN121, das die hTRT-codierende Sequenz enthält, inseriert in die EcoRI-Stelle von pBBS212, so dass die «antisense»-Sequenz der hTRT codierenden Sequenz unter der Kontrolle des MPSV-Promotors expriert wird. Die mit diesem Vektor verwendeten selektierbaren Marker sind Chlor/HygB/PAC.

#### 15 pGRN135

pGRN126 wurde vollständig mit MscI und SmaI geschnitten und zur Deletion von mehr als 95% der inserierten hTRT codierenden Sequenz erneut ligiert. Ein SmaI-MscI-Fragment wurde während dieses Prozesses erneut inseriert, um so für die Selektion die Cat-Aktivität wieder zu erzeugen. Dieses unge-  
 20 reinigte Plasmid wurde dann erneut mit Sall und EcoRI geschnitten und das das Initiationscodon der hTRT codierenden Sequenz enthaltende Fragment in die Sall-EcoRI-Stellen von pBBS212 inseriert. Danach entstand ein «antisense»-Expressionsplasmid, das die «antisense»-Sequenz des 5'-UTR und von  
 25 73 Basen der codierenden Sequenz expriert. Die mit diesem Vektor verwendbaren selektierbaren Marker sind Chlor/HygB/PAC.

#### pGRN136

30 Das HindIII-Sall-Fragment von pGRN126, das die hTRT codierende Sequenz enthält, inseriert in die HindIII-Sall-Stellen von pBBS242.

#### pGRN137

35 Das Sall-Sse8387I-Fragment von pGRN130, das die «Kozak»-Sequenz enthält, inseriert in die Sall-Sse8387I-Stellen von pGRN136.

#### pGRN138

40 Das EcoRI-Fragment von pGRN124, das hTRT ohne den 3'-UTR enthält, inseriert in die EcoRI-Stelle von pEGFP-C2, so dass die Orientierung von hTRT dieselbe ist wie für die EGFP-Domäne.

#### pGRN139

45 Das Oligonucleotid

5' -  
 CTGCCCTCAGACTTCAAGACCATCCTGGACTACAAGGACGACGATGACAAA

50 TGAATTCAGATCTGCGGCCGCCACCGCGGTGGAGCTCCAGC-3'

wurde zur Insertion des «IBI Flag» (IBI, New Haven, CT) am C-Terminus von hTRT in pGRN125 mittels in-vitro-Mutagenese verwendet und zur Erzeugung von EcoRI- und BglII-Stellen für die Clonierung. Auch COD2866 wurde zur Umwandlung von AmpS zu AmpR (Ampicillin-Resistenz) verwendet und  
 55 COD1941 zur Umwandlung von CatR (Chloramphenicol-Resistenz) zu Cats (Chloramphenicol-Empfindlichkeit).

#### pGRN140

60 Das NcoI-Fragment, das die stromaufwärts gelegene Sequenz von genomischer hTRT und das erste Intron von hTRT von lambdaG55 enthält, inseriert in die NcoI-Stelle von pBBS167. Das Fragment ist so orientiert, dass hTRT sich in derselben Richtung befindet wie der lac-Promotor.

65

## pGRN141

Das NcoI-Fragment, das die stromaufwärts gelegenen Sequenzen der genomischen hTERT und das erste Intron von hTERT von lambdaG55 enthält, inseriert in die NcoI-Stelle von pBBS167. Dieses Fragment ist so orientiert, dass hTERT im Vergleich zu dem lac-Promotor in der gegenläufigen Richtung ist.

## pGRN142

Das NotI-Fragment vom lambdaG45, das die vollständige genomische ~15 kbp-Insertion, einschliesslich des hTERTGenpromotorbereichs enthält, wurde in die NotI-Stelle von Plasmid pBBS185 inseriert. Das Fragment ist so orientiert, dass der hTERT-ORF sich in einer zu dem lac-Promotor gegensätzlichen Orientierung befindet.

## pGRN143

Das NotI-Fragment vom lambdaG45, das die vollständige genomische ~15 kbp-Insertion, einschliesslich des hTERTGenpromotorbereichs enthält, wurde in die NotI-Stelle von Plasmid pBBS185 inseriert. Das Fragment ist so orientiert, dass der hTERT-ORF sich in einer zu dem lac-Promotor selben Orientierung befindet.

## pGRN144

Sall-Deletion von pGRN140 zur Entfernung von lambda-Sequenzen.

## pGRN145

Dieser Vektor wurde zur Expression von hTERT-Sequenzen in Säugerzellen konstruiert. Das EcoRI-Fragment von pGRN137, das die hTERT-codierende Sequenz enthält, inseriert in die EcoRI-Stelle von pBBS212 zur Entfernung des Anteils der Sequenz, der dem 5'-UTR von hTERT-mRNA entspricht. Die hTERT codierende Sequenz ist so orientiert, dass sie unter der Kontrolle des MPSV-Promotors exprimiert wird. Die mit diesem Vektor verwendeten selektierbaren Marker sind Chlor/HygB/PAC.

## pGRN146

Dieser Vektor wurde für die Expression von hTERT-Sequenzen in Säugerzellen konstruiert. Das Sse8387I-NotI-Fragment von pGRN130, das die D869A-Mutation von hTERT enthält, inseriert in die Sse8387I-NotI-Stellen von pGRN137. Die mit diesem Vektor verwendeten selektierbaren Marker sind Ampicillin/HygB/PAC.

## pGRN147

Das Sse8387I-NotI-Fragment von pGRN139, das das «IBI Flag» (IBI, New Haven, CT) enthält, inseriert in die Sse8387I-NotI-Stellen von pGRN137.

## pGRN148

Das BglII-Eco47III-Fragment von pGRN144, das den Promotorbereich von hTERT enthält, inseriert in BglII-NruI-Stellen von pSEAP2, wobei ein hTERT-Promotor/Reporter-Konstrukt entstand.

## pGRN149

Dieser Vektor ist ein Zwischenvektor für die Konstruktion eines Expressionsvektors für ein hTERT-Fusionsprotein. Das mutagene Oligonucleotid

3' wurde zur Anfügung einer Csp45I-Stelle an den C-Terminus von hTERT durch in vitro-Mutagenese von pGRN125 verwendet. Das «Stop»-Codon von hTERT wurde deletiert und gegen eine Csp45I-Stelle ausgetauscht.

Der mit diesem Vektor verwendete selektierbare Marker ist Ampicillin.

## pGRN150

Das BglII-FspI-Fragment von pGRN144, das den Promotorbereich von hTERT enthält, inseriert in die BglII-NruI-Stellen von pSEAP2, wodurch ein hTERT-Promotor/Reporter-Konstrukt entstand.



## pGRN151

Dieser Vektor wurde zur Expression von hTERT-Sequenzen in Säugerzellen konstruiert. Das EcoRI-Fragment von pGRN147, das die hTERT codierende Sequenz enthält, inseriert in die EcoRI-Stelle von pBBS212, um so den Anteil der Sequenz zu entfernen, der dem 5'-UTR der hTERT-mRNA entspricht. Die hTERT codierende Sequenz ist so orientiert, dass sie unter der Kontrolle des MPSV-Promotors exprimiert wird. Die mit diesem Vektor verwendeten Marker sind Chlor/HygB/PAC.

## pGRN152

Das EcoRI-Fragment von pGRN146, das die hTERT codierende Sequenz enthält, inseriert in die EcoRI-Stelle von pBBS212 zur Entfernung des Anteils der Sequenz, der dem 5'-UTR von hTERT entspricht. Die hTERT codierende Sequenz ist so orientiert, dass sie unter der Kontrolle des MPSV-Promotors exprimiert wird.

## pGRN153

Das Styl-Fragment von pGRN130, das die D869→A-Mutation von hTERT enthält (eine hTERT-Variante codierende Sequenz) wurde in die Styl-Stellen von pGRN158 inseriert, wodurch ein Plasmid erhalten wurde, das die hTERT codierende Sequenz mit einer «Kozak-Consensus»-Sequenz an seinem 5'-Ende, eine «IBI FLAG»-Sequenz an seinem 3'-Ende der den C-Terminus codierende Bereich und die D869→A-Mutation enthält.

## pGRN154

Das das hTERT-Gen enthaltende EcoRI-Fragment von pGRN153, wurde in die EcoRI-Stelle von Plasmid pBS212 so inseriert, dass der hTERT-ORF sich in derselben Orientierung befindet wie der MPSV-Promotor. Dadurch entsteht ein MPSV-gesteuertes Expressionsplasmid, das das hTERT-Protein mit einer «Kozak-Consensus»-Sequenz an seinem aminoterminalen Ende eine «IBI FLAG» an seinem C-Terminus und die D869→A-Mutation exprimiert.

## pGRN155

Dieser Vektor wurde zur Expression von hTERT-Sequenzen in Säugerzellen konstruiert. Die Insertion enthielt cDNA von hTERT in vollständiger Länge ohne 5'- und 3'-UTR und «Kozak»-Sequenzen. Das EcoRI-Fragment von pGRN145, das die hTERT-cDNA mit der «Kozak-Consensus»-Sequenz jedoch keine 3'- oder 5'-UTR enthält, wurde in die EcoRI-Stelle von p91023(B) inseriert, so dass das hTERT in derselben Orientierung ist wie der DHFR-ORF. Dadurch entsteht ein Expressionsvektor für die transiente Expression von hTERT. Der mit diesem Vektor verwendete selektierbare Marker ist Tetracyclin.

## pGRN156

Dieser Vektor wurde zur Expression von hTERT-Sequenzen in Säugerzellen konstruiert. Das EcoRI-Fragment von pGRN146, das die D869A-Mutation der hTERT-cDNA mit der «Kozak-Consensus»-Sequenz ohne 3'- oder 5'-UTR enthält, inseriert in die EcoRI-Stelle von p91023(B), so dass hTERT in der gleichen Orientierung ist wie der DHFR-ORF. Dadurch entsteht ein Expressionsvektor für die transiente Expression von hTERT. Die Insertion enthielt cDNA von hTERT mit vollständiger Länge ohne 5'- und 3'-UTR, D869A und «Kozak»-Sequenzen. Der mit diesem Vektor verwendete selektierbare Marker ist Tetracyclin.

## pGRN157

Dieser Vektor wurde für die Expression von hTERT-Sequenzen in Säugerzellen konstruiert. Das EcoRI-Fragment von pGRN147, das die hTERT-cDNA mit dem «Kodak flag» am C-Terminus enthält, und die «Kozak-Consensus»-Sequenz ohne 3'- oder 5'-UTR, inseriert in die EcoRI-Stelle von p91023(B), so dass hTERT in der gleichen Orientierung ist wie der DHFR-ORF. Dadurch entsteht ein Expressionsvektor für die transiente Expression von hTERT. Die Insertion enthielt cDNA von hTERT mit vollständiger Länge ohne 5'- und 3'-UTR eine «FLAG»-Sequenz (Immunex Corp., Seattle, WA) und «Kozak»-Sequenzen. Der mit diesem Vektor verwendete selektierbare Marker ist Tetracyclin.

## pGRN158

Dieser Vektor wurde für die Expression und Mutagenese von TRT-Sequenzen in E. coli konstruiert. Das EcoRI-Fragment von pGRN151, das den hTERT-ORF enthält, inseriert in die EcoRI-Stelle von pBBS183, so dass der hTERT-ORF im Vergleich zu dem lac-Promotor in der genläufigen Orientierung

vorliegt. Die Insertion enthielt cDNA von hTRT mit vollständiger Länge ohne 5'- und 3'-UTR, eine «FLAG»-Sequenz (Immunex Corp., Seattle, WA) und «Kozak»-Sequenzen. Die codierende Sequenz wird von einem T7-Promotor gesteuert. Der mit diesem Vektor verwendete selektierbare Marker ist Ampicillin.

5 pGRN159

Dieser Vektor wurde zur Expression und Mutagenese von TRT-Sequenzen in E. coli konstruiert. Das *NotI*-*KpnI*-Fragment von pGRN138, das die Fusion von EGFP an hTRT enthält, inseriert in die *XbaI*-*KpnI*-Stellen von pBlueScriptIIKS+. Dies ergibt einen T7-Expressionsvektor für das Fusionsprotein (die codierende Sequenz wird von einem T7-Promotor gesteuert). Diese Insertion enthält hTRT-cDNA mit vollständiger Länge ohne den 3'-UTR als ein Fusionsprotein mit EGFP. Der mit diesem Vektor verwendete selektive Marker ist Ampicillin.

15 pGRN160

Dieser Vektor wurde zur Expression von «antisense»-hTR-Sequenzen in Säugerzellen konstruiert. Die codierende Sequenz wird von einem MPSV-Promotor gesteuert. Das *XhoI*-*NsiI*-Fragment von pGRN90, das hTR mit vollständiger Länge enthält inseriert in die *Sall*-SSE/8387I-Stellen von pBBS295. Dies ergibt einen transienten stabilen Vektor, der hTR in der «antisense»-Orientierung exprimiert. Ein GPT-Marker wurde in den Vektor eingebaut. Die mit diesem Vektor verwendeten selektierbaren Marker sind Chlor/gpt/PAC.

25 pGRN161

Dieser Vektor wurde zur Expression von «sense»-hTR-Sequenzen in Säugerzellen konstruiert. Ein *XhoI*-*NsiI*-Fragment von pGRN89, das hTR mit vollständiger Länge enthält, inseriert in die *Sall*-SSE/8387I-Stellen von pBBS295. Dies ergibt einen transienten/stabilen Vektor, der hTR in der «sense»-Orientierung exprimiert. Die codierende Sequenz wird von einem MPSV-Promotor gesteuert. Ein GPT-Marker wurde in den Vektor eingebaut. Die mit diesem Vektor verwendeten Marker sind Chlor/gpt/PAC.

pGRN162

35 Ein *XhoI*-*NsiI*-Fragment von pGRN87, das hTR mit vollständiger Länge enthält, inseriert in die *Sall*-SSE/8387I-Stellen von pBBS295. Dies ergibt einen transienten/stabilen Vektor, der verkürzte hTR (von Position +108 bis +435) in der «sense»-Orientierung exprimiert.

pGRN163

40 Dieser Vektor wurde zur Expression und Mutagenese von TRT-Sequenzen in E. coli konstruiert. Die codierende Sequenz wird von einem T7-Promotor gesteuert. RA45

(5'-GCCACCCCCGCGCTGCCTCGAGCTCCCCGCTGC-3')

45 wird in einer in vitro-Mutagenese zur Überführung des Initiations-Met in hTRT zu Leu verwendet und zur Einführung einer *XhoI*-Stelle in den beiden nächsten Codons nach dem Leu. Auch COD 1941 wurde zur Überführung von CatR nach CatS und Einführung einer *BspHI*-Stelle verwendet und COD 2866 zur Überführung vom AmpS zu AmpR, wobei eine *FspI*-Stelle eingeführt wurde. Der mit diesem Vektor verwendete selektierbare Marker ist Ampicillin.

50 pGRN164

Dieser Vektor wurde für die Expression von hTR-Sequenzen in E. coli konstruiert. Die Primer hTR+1

55 GGGGAAGCTTTAATACGACTCACTATA GGGTTGCGGAGGGTGGGCCTG-3'

und hTR +445

CCCCGGATCCTGCGCATGTGTGAGCCGAGTCCTGGG-3'

60 wurden zur Amplifikation eines Fragments von pGRN33 mittels PCR verwendet, das hTR mit vollständiger Länge und dem T7-Promotor an seinem 5'-Ende (wie in hTR+) enthält. Eine *BamHI*-*HindIII*-Spaltung des PCR-Produkts wurde in die *BamHI*-*HindIII*-Stellen von pUC119 inseriert. Die codierende Sequenz wird von einem T7-Promotor gesteuert. Der mit diesem Vektor verwendete selektierbare Marker ist Ampicillin.

65

## pGRN165

5 Dieser Vektor wurde für die Expression und Mutagenese von hTRT-Sequenzen in *E. coli* verwendet. Die codierende Sequenz wird von einem T7-Promotor gesteuert. Ein EcoRI-Fragment von pGRN145, das den hTRT-orf mit einer «Kozak»-Sequenz am vorderen Ende enthält, inseriert in die EcoRI-Stelle von pBluescriptIIISK+, so dass hTRT in derselben Orientierung vorliegt wie der T7-Promotor. Der mit diesem Vektor verwendete selektierbare Marker ist Ampicillin.

## pGRN166

10 Dieser Vektor wurde zur Expression und Mutagenese von TRTSequenzen in Säugerzellen konstruiert. Die codierende Sequenz wird von einem T7-Promotor gesteuert. Das EcoRI-Fragment von pGRN151, das den hTRT-ORF mit einer «Kozak»-Sequenz am vorderen Ende enthält und ein «IBI flag» am hinteren Ende, inseriert in die EcoRI-Stelle von pBluescriptIIISK+ so dass hTRT in der gleichen Orientierung  
15 vorliegt wie der T7-Promotor. Die Insertion enthielt hTRT-cDNA mit vollständiger Länge ohne 5'- und 3'-UTR, eine «FLAG»-Sequenz (Immunex Corp. Seattle, WA) und «Kozak»-Sequenzen. Der mit diesem Vektor verwendete selektierbare Marker ist Ampicillin.

## pGRN167

20 Ein AvrII-Stul-Fragment von pGRN144, das das 5'-Ende des hTRT-ORF enthält, inseriert in die XbaI-Stul-Stellen von pBES161.

## pGRN168

25 Das die optimierte hTRT-Expressionskassette enthaltende EcoRI-Fragment von pGRN145 wurde in die EcoRI-Stelle von pIND so inseriert, dass die hTRT codierende Sequenz in derselben Orientierung ist wie der miniCMV-Promotor.

## pGRN169

30 Das die optimierte hTRT-Expressionskassette enthaltende EcoRI-Fragment von pGRN145 wurde so in die EcoRI-Stelle von pIND inseriert, dass das hTRT in der umgekehrten Orientierung ist, bezogen auf den miniCMV-Promotor.

## pGRN170

35 Das die optimierte hTRT-Expressionskassette enthaltende EcoRI-Fragment von pGRN145 wurde so in die EcoRI-Stelle von pIND(sp1) inseriert, dass das hTRT in der gegenläufigen Orientierung vorliegt, bezogen auf den miniCMV-Promotor.

## pGRN171

45 Das Eco47II-NarI-Fragment von pGRN163 inseriert in die Eco47111-NarI-Stellen von pGRN167. Damit wird die M1L-Mutation in ein Fragment der genomischen hTRT-DNA eingeführt.

## pGRN172

50 Das BamHI-Stul-Fragment von pGRN171, das in hTRT die Mutation Met zu Leu enthält, inseriert in die BglII-NruI-Stellen von pSEAP2-«Basic».

## pGRN173

55 Das EcoRV-Eco47III-Fragment von pGRN144, das das 5'-Ende des hTRT-Promotorbereichs enthält, wurde in die SrfI-Eco47III-Stellen von pGRN172 inseriert. Dadurch entstand ein Promotor/Reporter-Plasmid, das den Promotorbereich von hTRT von etwa 2,3 kb stromaufwärts des Starts des hTRT-ORF bis unmittelbar nach dem ersten Intron im codierenden Bereich mit der Met1→Leu-Mutation enthält.

## pGTN174

60 Das die «optimierte» hTRT-Expressionskassette enthaltende EcoRI-Fragment von pGRN145 wurde in die EcoRI-Stelle von pIND(sp1) so inseriert, dass das hTRT dieselbe Orientierung hat wie der miniCMV-Promotor.

65

## Beispiel 7

## Rekonstitution von Telomerase-Aktivität

5 a) Co-Expression von hTERT und hTR in vitro

In diesem Beispiel wird die Co-Expression von hTERT und hTR mittels eines zellfreien in vitro-Expressionssystems beschrieben. Die Ergebnisse zeigen, dass das von pGRN121 codierte hTERT-Polypeptid ein katalytisch aktives Telomerase-Protein codiert, und dass die in vitro-Rekonstitution (IVR) des Telomerase-RNPs unter Verwendung rekombinant exprimierter hTERT und hTR erzielt werden kann.

Telomerase-Aktivität wurde durch Zugabe linearisierter Plasmide mit hTERT (pGRN121; 1 µg DNA, gespalten mit XbaI) und hTR (pHTR+1; 1 µg, gespalten mit FspI) zu einem gekoppelten Transkriptions/Translations-Reticulocyten-Lysat (Promega TNT®) rekonstituiert. pHTR+1 ist ein Plasmid, das nach Linearisierung mit FspI und anschließender Transkription durch T7-RNA-Polymerase ein Transkript mit 445 Nucleotiden erzeugt, das mit dem Nucleotid +1 beginnt und sich bis zu dem Nucleotid 446 von hTR erstreckt (Autexier et al., EMBO J. 15 (1996), 5928). Für eine 50 µl-Reaktion wurden die folgenden Bestandteile zugegeben: 2 µl TNT®-Puffer, 1 µl TNT®-T7-RNA-Polymerase, 1 µl 1 mM Aminosäuregemisch, 40 Einheiten Rnasin® RNase-Inhibitor, jeweils 1 µg linearisierte Matrizen-DNA und 25 µl TNT®-Reticulocytenlysate. Die Bestandteile wurden in dem vom Hersteller empfohlenen Verhältnis zugefügt und 90 Minuten bei 30°C inkubiert. Die Transkription wurde durch den T7-Promotor gesteuert und sie konnte auch vor der Zugabe von Reticulocytenlysate mit ähnlichen Ergebnissen durchgeführt werden. Nach der Inkubation wurden 5 und 10 µl der programmierten Transkriptions/Translations-Reaktion hinsichtlich Telomerase-Aktivität mittels des vorstehend beschriebenen TRAP-Assays (Autexier et al., a.a.O.) unter Verwendung von 20 PCR-Cyclen zur Signalamplifikation untersucht.

Die Ergebnisse der Rekonstitution sind in Fig. 10 gezeigt. Für jede Transkriptions-Translations-Reaktion gibt es drei Spuren. Die ersten zwei Spuren sind Duplikat-Assays und die dritte Spur ist eine zum Ausschluss PCR-erzeugter Artefakte vor der TRAP-Phase hitzedenaturierte (95°C, 5 Minuten) Duplikatprobe.

Wie in Fig. 10 gezeigt, hat das Reticulocytenlysate keine nachweisbare Telomerase-Aktivität (Spur 6). In ähnlicher Weise wird keine nachweisbare Aktivität beobachtet, wenn entweder hTR allein (Spur 1) oder das hTERT-Gen mit vollständiger Länge (Spur 4) zu dem Lysat gegeben werden. Wenn beide Komponenten zugegeben werden (Spur 2), wird Telomerase-Aktivität erzeugt, wie dies anhand des charakteristischen Musters von Wiederholungsleitern gezeigt wird. Wenn der carboxyterminale Bereich des hTERT-Gens durch Spaltung des Vektors mit NcoI entfernt wird («verkürztes hTERT») wird Telomerase-Aktivität aufgehoben (Spur 3). Spur 5 zeigt, dass die Translation der verkürzten hTERT allein keine Telomerase-Aktivität erzeugt. Spur «R8» zeigt eine positive Kontrolle für eine Telomerase-Produktleiter, die durch «TRAP» von TSR8 (einem synthetischen Telomerase-Produkt mit einer Nucleotidsequenz des Standards für Quantifizierung) erzeugt wird

(5'-ATTCCGTCGAGCAGAGTTAG{GGTTAG}<sub>7-3'</sub>)).

45 B) Mischen von hTERT und hTR in vitro

Die in vitro-Rekonstitution von Telomerase-Aktivität wurde auch durch Vermischen erzielt. hTERT wurde, wie vorstehend beschrieben, transkribiert und translatiert, jedoch ohne die Zugabe des hTR-Plasmids. Die Rekonstitution des TelomeraseRNP wurde dann durch Vermischen des hTERT-Translationsgemisches mit hTR (vorher durch die Transkription mit T7-RNA-Polymerase von pHTR+1-Fsp erzeugt) im Verhältnis von 2 Al hTERT-Translationsgemisch zu 2 µl hTR (1 µg) und anschließender 90minütiger Inkubation bei 30°C erzielt. Dieses Verfahren der hTERT-hTR-Rekonstitution wird als «verbundene Rekonstitution» oder «verbundene IVR» bezeichnet. In diesem Gemisch ist Telomerase-Aktivität vorhanden (d.h. kann nachgewiesen werden). Ein verbessertes Signal wurde nach partieller Reinigung der Aktivität durch DEAE-Chromatographie beobachtet. In diesem Fall wurde eine «Millipore Ultrafree- MC DEAE Zentralfilter»-Vorrichtungen gemäss Standardverfahren (d.h. gemäss den Anweisungen des Herstellers) verwendet. Die verwendeten Puffer waren: hypo0.1, hypo0.2 und hypo1.0, wobei hypo 20 mM Hepes-KOH, pH-Wert 7,9, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM EGTA, 10% Glycerin, 0,1% NP-40, 1 mM DTT, 1 mM Natriummetabisulfit, 1 mM Benzamidin und 0,2 mM Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF) ist und wobei sich 0,1, 0,2 und 1,0 auf 0,1, 0,2 oder 1,0 M KCl beziehen. Die Filter wurden mit hypo1.0 vorkonditioniert, mit hypo0.1 gewaschen, danach wurde die rekonstituierte Telomerase aufgeladen, die Säule mit hypo0.1 und im Anschluss daran hypo0.2 gewaschen und die rekonstituierte Telomerase wurde mit hypo 1.0 mit dem halben Volumen im Vergleich zu dem Aufladenvolumen eluiert. Diese Zubereitung konnte bei -70°C in gefrorenem Zustand aufbewahrt werden und sie behält Aktivität.

Telomerase-Aktivität wurde in einem zweistufigen Verfahren untersucht. Im ersten Schritt wurde ein

üblicher Telomerase-Assay wie von Morin, Cell 59 (1989), 521 beschrieben durchgeführt, ausser dass keine radioaktive Markierung verwendet wurde. Bei dem zweiten Schritt wurde in Aliquot mittels des «TRAP»-Verfahrens für 20 bis 30 Cyclen (wie vorstehend beschrieben) untersucht. Der übliche Telomerase-Assay wurde so durchgeführt, dass 1 bis 10 µl rekonstituierte Telomerase untersucht wurden in 25 mM Tris-HCl, pH-Wert 8,3, 50 mM Kaliumacetat, 1 mM EGTA, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 2 mM dATP, 2 mM TTP, 10 µM dGTP und 1 µM Primer (üblicherweise M2, AATCCGTCGAGCAGAGTT) in einem Endvolumen von 40 bis 50 µl bei 30°C und für 60 bis 180 Minuten. Die Reaktion wurde durch 5minütiges Erhitzen auf 95°C gestoppt und mit 1–10 µl des Gemisches des ersten Schritts wurde der zweite Schritt, die «TRAP»-Reaktion (50 µl) durchgeführt.

In zusätzlichen Experimenten wurde die Synthese von hTERT und hTR während einer in vitro-Rekonstitution anhand des Einbaus von 35S-Methionin bzw. Northern blotting überwacht. Proteine mit etwa der vorhergesagten Grösse wurden für hTERT (127 kD), hTERT-Nco (85 kD) und pro90hTERT (90 kD) in etwa äquimolaren Mengen (relativ zueinander) synthetisiert. Die Northern-Analyse zeigte, dass die hTR-Synthese die korrekte Grösse (445 Nucleotide) aufwies und vorherrschend intakt war.

Für den Fachmann sind Variationen des oben beschriebenen Rekonstitutionsprotokolls offensichtlich. Beispielsweise können folgende Parameter variiert werden: Rekonstitutionszeit und Temperatur, das Vorhandensein oder die Konzentration von Bestandteilen wie monovalente Salze (z.B. NaCl, KCl, Kaliumacetat, Kaliumglutamat etc.), divalente Salze (MgCl<sub>2</sub>, MnCl<sub>2</sub>, MgSO<sub>4</sub>, etc.), Denaturierungsmittel (Harnstoff, Formamid etc.), Detergenzien (NP-40, Tween, CHAPS, etc.). Es können auch alternative verbesserte Reinigungsverfahren (z.B. Immunpräzipitation, Affinitätschromatographie oder Standardchromatographie) angewandt werden. Diese und andere Parameter können auf systematische Weise variiert werden, um so die Bedingungen für bestimmte Assays oder andere Rekonstitutionsprotokolle zu optimieren.

#### C) Die Rekonstitution mittels hTERT-Varianten und Fusionsproteinen

Rekonstitution von katalytischer Telomerase-Aktivität trat auf, wenn EGFP-hTERT eine Fusion des «enhanced green fluorescent-Protein an hTERT (siehe Beispiel 15) oder «Epitop-tagged» hTERT (IBI FLAG, siehe Beispiels 6) mit hTR coexprimiert wurden, wobei beide Telomerase-Aktivität auf ungefähr Wildtyp-Spiegel rekonstituierten.

Im Gegensatz dazu wurde Telomerase-Aktivität nicht rekonstituiert, wenn die hTERT-Variante pro90hTERT (der die RT-Motive B', C, D und E fehlen) verwendet wurde. Dies zeigt, dass pro90hTERT keine katalytische Telomerase-Aktivität besitzt, wobei diese andere Aktivitäten besitzen könnte (z.B. die Fähigkeit zur RNA (d.h. hTR)-Bindung und sie könnte auch als dominant-negativer Regulator von Telomerase in vivo, wie vorstehend beschrieben, wirken.

#### D) Die Untersuchung von in vitro-rekonstituierter Telomerase-Aktivität mittels des Gel-Blots und des üblichen Telomerase-Assays

Das folgende Beispiel zeigt, dass in vitro-rekonstituierte Telomerase (IVR) zusätzlich zu auf Amplifikation basierenden Assays, (d.h. TRAP) mittels üblicher Telomerase-Assays untersucht werden kann. Telomerase wurde in vitro rekonstituiert (IVR) wie in Teil (B) vorstehend beschrieben (das «verbundene Rekonstitutions»-Verfahren) wonach sich eine DEAE-Reinigung, wie vorstehend beschrieben, anschloss. Die IVR-Telomerase wurde mittels des Gel-Blot-Assays unter den folgenden Reaktionsbedingungen untersucht: 1 bis 10 µl IVR-Telomerase in 25 mM Tris-HCl, pH-Wert 8,3, 50 mM Kaliumacetat, 1 mM EGTA, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,8 mM dATP, 0,8 mM TTP, 1,0 mM dGTP und 1 µM Primer (M2, AATCCGTCGAGCAGAGTT; oder H3.03, TTAGGGTTAGGGTTAGGG) für 180 Minuten bei 30°C und einem Endvolumen von 40 µl. Die synthetisierte Telomer-DNA wurde anhand von Standard-Verfahren isoliert, auf einem Gel mit 8%igem Polyacrylamid und 8 M Harnstoff aufgetrennt, auf eine Nylon-Membran transferiert und unter Verwendung der in dem Dot-Blot-Assay verwendeten <sup>32</sup>P-(CCCTAA)n-Ribonucleotidsonde abge sucht. Mittels dieser Sonde konnte eine Leiter von sechs Nucleotiden in der Spur identifiziert werden, die 10 µl IVR-Telomerase repräsentiert, was äquivalent war zu der Leiter, die für 5 µl nativer nucleärer, mit «mono Q» und Heparinchromatographie gereinigter Telomerase beobachtet wurde. Die Ergebnisse zeigen, dass IVR-Telomerase äquivalent zu nativer Telomerase eine prozessive katalytische Telomerase-Aktivität aufweist.

Die IVR-Telomerase («verbundene Rekonstitution») wurde auch anhand des üblichen, auf dem Einbau von <sup>32</sup>P-dGTP basierenden Telomerase-Assays untersucht. Die so rekonstituierte Telomerase, die danach über DEAE-Reinigung, wie vorstehend beschrieben, gereinigt wurde, wurde sowohl unter prozessiven als auch nicht-prozessiven Reaktionsbedingungen untersucht. Die Assay-Bedingungen waren: 5–10 µl rekonstituierte Telomerase («verbundene Rekonstitution») in 25 mM Tris-HCl, pH-Wert 8,3, 50 mM Kaliumacetat, 1 mM EGTA, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 2 mM dATP, 2 mM TTP mit 10 µM <sup>32</sup>P-dGTP (72 Ci/mMol) (für den Assay hinsichtlich prozessiver Bedingungen) oder 1 µM <sup>32</sup>P-dGTP (720 Ci/mMol) (für nicht-prozessive Bedingungen) und 1 µM Primer (d.h. H3.03 TTAGGGTTAGGGTTAGGG) bei 30°C (für die prozessive Reaktion) oder 37°C für die nicht-prozessive Reaktion für 180 Minuten in einem Endvolumen von 40 µl. Die synthetisierte Telomer-DNA wurde mittels Standardverfahren isoliert und auf einem

Sequenzierungsgel mit 8%igem Polyacrylamid und 8 M Harnstoff aufgetrennt. Die prozessive Reaktion zeigte eine schwächere Leiter von sechs Nucleotiden, was mit einer prozessiven Telomerase-Reaktion übereinstimmt und bei der nicht-prozessiven Reaktion wurde eine Wiederholungseinheit hinzugefügt, ein Muster, das äquivalent zu der Kontrollreaktion mit einer Präparation nativer Telomerase ist. Übliche Assays unter Verwendung von Telomerase «verbundene Rekonstitution» sind bei der Suche nach Telomerase-Modulatoren, wie hier beschrieben, nützlich, sowie auch bei anderen Anwendungen, wie beispielsweise der Aufklärung von strukturellen und funktionellen Eigenschaften von Telomerase.

#### E) In vitro rekonstituierte Telomerase erkennt 3'-Enden von Primern

Dieses Experiment zeigt, dass durch «verbundene Rekonstitution» hergestellte Telomerase 3'-Enden von Primern erkennt, äquivalent zu nativer (gereinigter) Telomerase. Telomerase bildet eine Basengepaarte Duplex zwischen dem 3'-Ende eines Primers und dem Matrizenbereich von hTR und fügt das nächste vorgesehene Nucleotid an (Morin, 1989, a.a.O.). Um zu verifizieren, dass (rekombinante) IVR-Telomerase («verbundene Rekonstitution») die gleiche Eigenschaft aufweist, wurden die Reaktionen von Primern mit ---GGG oder ---TAG-3'-Enden (AATCCGTCGAGCAGAGGG bzw. AATCCGTCGAGCAGATAG) mit einem Primer verglichen mit einem ---GTT 3'-Terminus (M2; AATCCGTCGAGCAGAGTT; der Standard-«TRAP»-Primer), wobei in vitro rekonstituierte und native Telomerase verwendet wurden, die durch den Zwei-Stufen Assay (üblich/TRAP), der vorstehend ausführlich beschrieben wurde, untersucht wurden. Die Produktleiten der Primer ---GGG und ---TAG verschoben sich um +4 bzw. +2 im Vergleich zu dem Standardprimer (---GTT 3'-Ende); derselbe Effekt wurde mit nativer Telomerase beobachtet. Dieses Experiment zeigt, dass in vitro-rekonstituierte («verbundene Rekonstitution») und native Telomerase Primerenden auf die gleiche Weise erkennen.

Diese Ergebnisse (zusammen mit den vorstehenden Ergebnissen, die zeigen, dass IVR-Telomerase sowohl prozessive als auch nicht-prozessive katalytische Aktivität besitzt) zeigen an, dass IVR-Telomerase eine ähnliche Struktur und ähnliche Eigenschaften im Vergleich zu nativer oder gereinigter Telomerase besitzt.

#### Beispiel 8

#### Herstellung von Anti-hTERT-Antikörpern

##### A) Die Herstellung von anti-hTERT-Antikörpern gegen hTERT-Peptide

Zur Herstellung von anti-hTERT-Antikörpern wurden die folgenden Peptide von hTERT mit der Hinzufügung von C (Cystein) als der Amino-terminale Rest (siehe Fig. 54) synthetisiert:

S-1: FFY VTE TTF QKN RLF FYR KSV WSK

S-2: RQH LKR VQL RDV SEA EVR QHR EA

S-3: ART FRR EKR AER LTS RVK ALF SVL NYE

A-3: PAL LTS RLR FIP KPD GLR PIV NMD YVY

Die Cystein-Einheit wurde zur Immobilisierung (d.h. kovalente Verknüpfung) der Peptide an BSA- und KLH- («Keyhole limpet» Häemocyanin)-Trägerproteine verwendet. Die KLH-Peptide wurden als Antigen verwendet. Die BSA-Peptidkonjugate dienten als Material für ELISAs zum Testen der Spezifität von Immunantisera.

Die KLH-Peptidkonjugate wurden in «New Zealand White»-Kaninchen injiziert. Die einleitenden Injektionen wurden proximal zu den Lymphknoten der Achselhöhle und der Leisten verabreicht. Nachfolgende Injektionen wurden intramuskulär gegeben. Für einleitende Injektionen war das Antigen mit vollständigem Freund'schen Adjuvans emulgiert, für nachfolgende Injektionen wurde unvollständiges Freund'sches Adjuvans verwendet. Bei den Kaninchen folgte ein Auffrischungs-Impfzyklus von 3 Wochen, wobei 50 ml Blut, die 20 bis 25 ml Serum lieferten, 10 Tage nach jeder Auffrischungsimpfung entnommen wurden. Antiseren gegen jedes der vier Peptide erkannten die hTERT-Einheit von rekombinantem hTERT-Fusionsprotein (GST-HIS8-hTERT-Fragment 2426 bis 3274) auf WesternBlots (siehe Beispiel 6).

Unter Verwendung einer partiell gereinigten Telomerase-Fraktion von menschlichen 293-Zellen (eine etwa 1000fache Reinigung im Vergleich zum nucleären Rohextrakt), die gemäss der Beschreibung in der parallelen US-Patentanmeldung mit der Serien-Nr. 08/833,37 (siehe auch PCT-Anmeldung Nr. 97/06012) hergestellt und mit anti-S-2-Antikörpern affinitätsgereinigt worden war, konnte auf einem Western-Blot eine 130 kD-Proteindublette nachgewiesen werden. Es wurde ein empfindliches Chemilumineszenz-Nachweisverfahren angewandt («SuperSignal»-Chemilumineszenzsubstrate, Pierce), das Signal

auf dem Blot war jedoch schwach, was darauf hindeutet, dass hTRT in diesen unsterblichen Zellen in geringer oder sehr geringer Häufigkeit vorhanden ist. Das Auftreten einer Dublette ist konsistent mit einer posttranslationalen Modifizierung von hTRT, d.h. Phosphorylierung oder Glykosylierung.

Zur Affinitätsreinigung wurde das S-2-Peptid an «SulfoLink» (Pierce, Rockford, IL) über seinen N-terminalen Cysteinrest gemäss dem Protokoll des Herstellers immobilisiert. Erstes Blutserum von einem mit dem KLH-S-2-Peptid an die genimmunisierten Kaninchen wurde über eine S-2-«SulfoLink» geladen und spezifisch an das S-2-Peptid gebundene Antikörper wurden eluiert.

#### B) Herstellung von anti-hTRT-Antikörpern gegen hTRT-Fusionsproteine

GST-hTRT-Fusionsproteine wurden in *E. coli* als das GST-hTRT-Fragment #4 (Nucleotide 3272–4177) und das GST-His8-hTRT-Fragment #3 (Nucleotide 2426 bis 3274), wie in Beispiel 6 beschrieben, exprimiert. Die Fusionsproteine wurden als unlösliches Protein gereinigt und die Reinheit des Antigens wurde über SDS-Polyacrylamidgele untersucht und auf etwa 75% Reinheit bezüglich des rekombinanten Proteins GST-hTRT-Fragment #4 und über 75% Reinheit für das rekombinante Protein GST-His8-hTRT-Fragment #3 geschätzt. (Routineverfahren können zur Gewinnung dieser und anderer Fusionsproteine mit einer Reinheit über 90% verwendet werden). Diese rekombinanten Proteine wurden zur Immunisierung sowohl von «New Zealand White»-Kaninchen als auch weiblichen Balb/c-Mäusen verwendet. Für einleitende Injektionen wurde das Antigen mit vollständigen Freund'schem Adjuvans emulgiert, für nachfolgende Injektionen wurde unvollständiges Freund'sches Adjuvans verwendet. Für die Kaninchen und Mäuse erfolgte ein 3-wöchiger Auffrischungsimpfzyklus, wobei Blut 10 Tage nach jeder Auffrischungsimpfung entnommen wurde.

Die erste und zweite Blutentnahme sowohl von den Mäusen als auch den Kaninchen wurde hinsichtlich der Anwesenheit von anti-hTRT-Antikörpern nach Entfernung von anti-GST-Antikörpern unter Verwendung einer immobilisierten GST enthaltenden Matrix getestet. Die Antiseren wurden auf anti-hTRT-Antikörpern durch Western-Blots unter Verwendung eines immobilisierten rekombinanten GST-hTRT-Fusionsproteins getestet und mittels Immunpräzipitation unter Verwendung des partiell gereinigten nativen Telomeraseenzym. Bei diesen frühen Blutentnahmen konnte kein Signal beobachtet werden; es wird davon ausgegangen, dass sich die Titer von anti-hTRT-Antikörpern bei nachfolgenden Blutentnahmen erhöhen.

#### Beispiel 9

Nachweis einer hTRT-mRNA die der RNA der  $\Delta 182$ -Variante entspricht

Poly-A<sup>+</sup>-RNA von menschlichen Hoden und der 293-Zelllinie wurde hinsichtlich hTRT-mRNA mittels RT-PCR und «nested»-Primern analysiert. Der erste Primersatz war TCP1.1 und TCP1.15, der zweite Primersatz TCP1.14 und b1ITCP6. Die Amplifikation mit beiden Primersätzen ergab zwei Produkte, die sich um 182 bp unterschieden. Die grösseren und kleineren Produkte von RNA aus Hoden wurden sequenziert und es stellte sich heraus, dass sie genau pGRN121 (Fig. 16) bzw. dem Clon 712562 (Fig. 18) entsprachen. Das hTRT-RNA-Produkt der Variante wurde in mRNA von SW39i, OVCAR4, 293 und Hoden beobachtet.

Zusätzliche Experimente wurden durchgeführt, um zu zeigen, dass die  $\Delta 182$  cDNA nicht ein Artefact der reversen Transkription war. Kurz zusammengefasst, hTRT-RNA (d.h. ohne Deletion) wurde durch in vitro-Transkription von pGRN121 zur Verwendung als Matrize für RT-PCR hergestellt. Getrennt davon wurden cDNA-Synthese-Reaktionen mittels der «Superscript®» reverser Transkriptase (Bethesda Research Laboratories, Bethesda MD) bei 42°C oder 50°C mit Zufallsprimern oder einem spezifischen Primer durchgeführt. Nach 15 PCR-Cyclen war das längere Produkt nachweisbar, jedoch nicht das kleinere Produkt (d.h. das der Deletion entsprechende, selbst nicht nach 30 oder mehr Cyclen. Dieses zeigt an, dass das RTPCR-Produkt kein Artefact ist.

#### Beispiel 10

Sequenzierung von Hoden-hTRT-mRNA

Die Sequenz der in Hoden vorzufindenden Form von hTRT-RNA wurde durch direkte Manuell-Sequenzierung von DNA-Fragmenten bestimmt, die mittels PCR von Hoden-cDNA («Marathon»-Hoden-cDNA, Clontech, San Diego, CA) unter Verwendung eines «ThermoSequenase radiolabeled terminator cycle»-Sequenzierungskits (Amersham Life Science) erzeugt. Die PCR-Reaktionen wurden mittels «nested»-PCR, wie in Tabelle 7 gezeigt, durchgeführt, soweit nicht anders angegeben. In allen Fällen wurde eine negative Kontrollreaktion mit Primern, jedoch ohne cDNA durchgeführt. Das Fehlen eines Produkts in der Kontrollreaktion zeigte, dass die von der Reaktion mit cDNA stammenden Produkte nicht aufgrund einer Kontamination mit hTRT von pGRN121 oder anderen Zellquellen (z.B. 293-Zellen) vorhanden waren. Die DNA-Fragmente wurden zur Reinigung der DNA vor der Sequenzierung aus Agarosegelen ausgeschnitten.

Die Sequenz der Hoden-mRNA, die den Basen 27 bis 3553 der Insertionssequenz von pGRN121 (SEQ. ID. Nr. 1) entspricht und den gesamten hTRT-ORF (Basen S6 bis 3451) wurde erhalten. In diesem Bereich zeigten sich keine Unterschiede zwischen den Hoden- und pGRN121-Sequenzen.

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65



Tabelle 8

Fragment	Primersatz 1	Primersatz 2	End- größe	Primer für SEQ
0A	na	KJ20 / KJ22	208	KJ20, KJ22
A	KJ20 / TCPI.13	TCPI.40 / TCPI.34	556	TCPI.52, TCPI.39, KJ22, TCPI.40, TCPI.41, TCPI.30, TCPI.34, TCPI.49
B	TCPI.12 / TCPI.32B	TCPI.35 / TCPI.21	492	TCPI.35, TCPI.28, TCPI.38, TCPI.21, TCPI.46, TCPI.33, TCPI.48
C	TCPI.65 / TCPI.66	TCPI.67 / TCPI.68	818	TCPI.67, TCPI.32, TCPI.69, TCPI.68, TCPI.24, TCPI.44, KJ03
D2	KJ01 / bnlTCPI6	L11 / TCPI.6	516	L12, L11, TCPI.6, bnlTCPI4, TCPI.13, TCPI.77, TCPI.1
D3	TCPI.12 / TCPI.7	TCPI.14 / TCPI.15	604	TCPI.6, TCPI.14, TCPI.73, TCPI.78, TCPI.25, TCPI.15, TCPI.76
EF	na	TCPI.74 / TCPI.7	201	TCPI.74, TCPI.7, TCPI.75, TCPI.15, TCPI.3
E	TCPI.3 / TCPI.4	TCPI.2 / TCPI.9	687	TCPI.2, TCPI.8, TCPI.9, TCPI.26
F	TCPI.26 / UTR2	TCPI.10 / TCPI.4	377	TCPI.4, TCPI.10, TCPI.11

## Beispiel 11

## Nachweis von hTERT-mRNA durch RNase-Schutzreaktion

5 RNase-Schutzassays können zum Nachweis, zur Überwachung oder zur Diagnose hinsichtlich der Anwesenheit einer hTERT-mRNA oder der mRNA einer Variante verwendet werden. Eine veranschaulichende Sonde für einen solchen Assay ist eine in vitro-synthetisierte RNA, die Sequenzen umfasst, die komplementär zu hTERT-mRNA-Sequenzen sind, und zusätzliche, nicht komplementäre Sequenzen. Die letzteren Sequenzen sind deshalb von Vorteil, um die Sonde mit vollständiger Länge von dem Fragment der Sonde unterscheiden zu können, das von einem positiven Ergebnis in dem Assay herrührt. In einem positiven Assay werden die komplementären Sequenzen der Sonde vor einer Spaltung mit RNase geschützt, da sie mit der hTERT-mRNA hybridisiert sind. Die nicht-komplementären Sequenzen werden von der Sonde in Gegenwart von RNase und komplementärer Zielnucleinsäure abgespalten.

10 Zwei Sonden für die RNase-Schutzassays sind zur Veranschaulichung beschrieben, wobei jede in dem Assay verwendet werden kann. Die Sonden unterscheiden sich in ihren zu hTERT komplementären Sequenzen, enthalten jedoch identische nichtkomplementäre Sequenzen, die in dieser Ausführungsform von der späten Leadersequenz der mRNA von SV40 stammen. In 5'-3'-Richtung umfasst die erste Sonde 33 Nucleotide einer nicht-komplementären Sequenz und 194 Nucleotide einer Sequenz, die komplementär zu den hTERT-Nucleotiden 2513 bis 2707 ist für eine Grösse der Sonde mit vollständiger Länge von 227 Nucleotiden. In 5'-3'-Richtung umfasst die zweite Sonde 33 Nucleotide einer nicht komplementären Sequenz und 198 Nucleotide einer Sequenz, die komplementär zu den hTERT-Nucleotiden 2837 bis 3035 ist für eine Grösse der Sonde mit vollständiger Länge von 231 Nucleotiden. Zur Durchführung des Assays kann jede der beiden Sonden mit RNA d.h. PolyA<sup>+</sup>-RNA von einer Testprobe hybridisiert werden und im Anschluss daran werden T1-Ribonuclease und RNase A zugegeben. Nach der Spaltung wird die Sonden-RNA gereinigt und durch Gelelektrophorese analysiert. Der Nachweis eines 194 Nucleotide langen Fragments der Nucleotidsonde mit einer Länge von 227 Nucleotiden oder eines 198 Nucleotide langen Fragments der Sonde mit einer Länge von 231 Nucleotiden ist ein Zeichen für die Anwesenheit von hTERT-mRNA in der Probe.

15 Die in diesem Beispiel beschriebenen veranschaulichenden Sonden für den RNase-Schutzassay können durch in vitro-Transkription mittels T7-RNA-Polymerase erzeugt werden. Radioaktive oder anderweitig markierte Ribonucleotide können für die Synthese von markierten Sonden eingeschlossen werden. Die Matrizen für die in vitro-Transkriptionsreaktion zur Herstellung der RNA-Sonden sind PCR-Produkte. Diese illustrativen Sonden können nach PCR-Amplifikation von pGRN121-DNA mittels Primern, die den entsprechenden komplementären Bereich des hTERT-Gens oder der hTERT-mRNA umspannen, mit T7-Polymerase synthetisiert werden. Ausserdem enthält der Stromabwärts-Primer T7-RNA-Polymerase-Motorsequenzen und die nicht-komplementären Sequenzen.

20 Für die Erzeugung der ersten Sonde für den RNase-Schutzassay wird das PCR-Produkt von dem folgenden Primer-Paar T701 und reverse 01) verwendet:

40 T701 5'-GGGAGATCT TAATACGACTCACTATAG ATTCA GGCCATGGTG  
CTGCGCCGGC TGTC A GGCTCCC ACGACGTAGT CCATGTTAC-3'

und reverse 01

45 5'-GGGTCTAGAT CCGGAAGAGTGT CTGGAGCAAG-3'

50 Zur Erzeugung der zweiten Sonde für den RNase-Schutzassay wird das PCR-Produkt von dem folgenden Primerpaar (T702 und reverse 02) verwendet:

55 T702 5'-GGGAGATCT TAATACGACTCACTATAG ATTCA GGCCATGGTG  
CTGCGCCGGC TGTC A GGGCG GCCTTCTGGA CCACGGCATA CC-3'

und reverse 02

5'-G GTCTAGA CGATATCC ACAGGGCCTG GCGC-3'

60

65

## Beispiel 12

Konstruktion eines phylogenetischen Stammbaums durch Vergleich von hTERT mit anderen reversen Transkriptasen

5

Ein phylogenetischer Stammbaum (Fig. 6) wurde durch Vergleich der sieben von Xiong und Eickbush (EMBO J. 9 (1990), 3353) RT-Domänen konstruiert. Nach Sequenzalignment der Motive 1, 2 und A-E von 4 TRTs, 67 RTs und 3 RNA-Polymerasen wurde der Stammbaum unter Verwendung des «NJ («Neighbor joining»)-Verfahrens (Saitou und Nei, Mol. Biol. Evol. 4 (1987), 4406) konstruiert. Elemente von der gleichen Klasse, die auf dem gleichen Zweig des Stammbaums lokalisiert sind, sind vereinfacht als Kästchen wiedergegeben. Die Länge jedes Kästchens entspricht dem am meisten divergenten Element innerhalb des Kästchens.

Die TRTs scheinen mit den RTs, die mit msDNA, Gruppe II-Introns und nicht-LTR (lange terminale Wiederholungseinheiten)-Retrotransposons enger verwandt zu sein als mit dem LTR-Retrotransposon und viralen RTs. Die Verwandtschaft der Telomerase-RTs zu dem nicht-LTR-Zweig von Retroelementen ist sehr interessant, geht man davon aus, dass diese letzteren Elemente Telomerase für die Telomer-Beibehaltung in *Drosophila* ausgetauscht haben. Die auffallendste Beobachtung ist jedoch, dass die TRTs eine diskrete Untergruppe bilden, die mit den RNA-abhängigen RNA-Polymerasen von +-strängigen RNA-Viren, wie beispielsweise Poliovirus, beinahe genau so eng verwandt ist wie mit einem der bereits bekannten RTs. Wenn man in Erwägung zieht, dass die vier Telomerasegene von evolutionär entfernten Organismen stammen, – Protozoen, Pilze und Säuger – kann diese getrennte Gruppierung nicht durch das Fehlen von phylogenetischer Vielfalt in dem Datensatz erklärt werden. Diese frühzeitige Aufgabelung legt statt dessen nahe, dass die Telomerase-RTs eine sehr alte Gruppe sind, die vielleicht mit dem ersten Eukaryoten entstand.

GenBank-Protein-Identifizierungsnummern oder Zugangsnummern, die für phylogenetische Analyse verwendet wurden, sind:

msDNAs (94535, 134069, 134074, 134075, 134078), Gruppe II Introns (483039, 101880, 1332208, 1334433, 1334435, 133345, 1353081), mitochondriales Plasmid/RTL (903835, 134084), nicht-LTR Retrotransposons (140023, 84806, 103221, 103353, 134083, 435415, 103015, 1335673, 85020, 141475, 106903, 130402, U0551, 903695, 940390, 2055276, L08889), LTR-Retrotransposons (74599, 85105, 130582, 99712, 83589, 84126, 479443, 224319, 130398, 130583, 1335652, 173088, 226407, 101042, 1078824), Hepadnaviren (1 18876, 1706510, 118894), Caulimoviren (331554, 130600, 130593, 93553), Retroviren (130601, 325465, 74601, 130587, 130671, 130607, 130629, 130589, 130631, 1346746, 130651, 130635, 1780973, 130646). Die Ausrichtung wurde mittels «ClustalW 1.5» (J.D. Thompson, D.G. Higgins, T.J. Gibson, Nucleic Acids Res. 22, (1994), 4673) und «PHYLP 3.5» (J. Felsenstein, Cladistics 5 (1989), 164) analysiert.

## Beispiel 13

Transfektion von kultivierten menschlichen Fibroblasten (BJ) mit einem Kontrollplasmid und einem hTERT codierenden Plasmid

Dieses Beispiel zeigt, dass die Expression eines rekombinanten hTERT-Proteins in einer Säugerzelle zur Erzeugung einer aktiven Telomerase führt.

Subkonfluente Bi-Fibroblasten wurden trypsinisiert und in frischem Medium (DMEM/199, 10% fötales Kälberserum enthaltend) bei einer Konzentration von  $4 \times 10^6$  Zellen/ml resuspendiert. Die Zellen wurden mittels Elektroporation mit dem «Gene Pulser™»-Elektroporator von BioRad transfiziert. Gegebenenfalls kann man auch Zellen unter Verwendung des «Superfect™»-Reagenz (Qiagen) gemäss den Anleitungen des Herstellers transfizieren. Für die Elektroporation wurden 500 µl Zellsuspension in eine Elektroporationskuvette (BioRad, 0,4 cm Elektrodenabstand) gegeben. Plasmid-DNA (2 µg) wurden zu den Küvetten gegeben und die Suspension vorsichtig gemischt und auf Eis 5 Minuten inkubiert. Das Kontrollplasmid (pBBS212) enthielt keine Insertion hinter dem MPSV-Promotor und das experimentelle Plasmid (pGRN133) exprimiert hTERT vom MPSV-Promotor. Die Zellen wurden bei 300 V und 960 µFD einer Elektroporation unterworfen. Nach Abgabe des Impulses wurden die Küvetten vor der Plattierung auf 100 mm-Gewebekulturplatten in Medium etwa 5 Minuten auf Eis gehalten. Nach 6 Stunden wurde das Medium gegen neues Medium ausgetauscht. 72 Stunden nach der Transfektion wurden die Zellen trypsinisiert, einmal mit PBS gewaschen, pelletiert und in gefrorenem Zustand bei -80°C aufbewahrt. Zellextrakte wurden bei einer Konzentration von 25 000 Zellen/µl durch ein modifiziertes Lyseverfahren mittels Detergentien präpariert (siehe Bodnar et al., Exp. Cell Res. 228 (1996), 58 und Kim et al., Science 266 (1994) 2011 und die Beschreibung in Patenten und Publikationen, die sich auf den vorstehenden TRAP-Assay beziehen) und Telomerase-Aktivität in den Zellextrakten wurde mittels eines modifizierten auf PCR basierenden TRAP-Assays bestimmt (Kim et al., 1994, Bodnar et al., 1996). Kurz zusammengefasst,  $5 \times 10^4$  Zelläquivalente wurden für den Telomerase-Primer Verlängerungsteil der Reaktion verwendet. Während der Extrakt typischerweise direkt von der Telomerase-Verlängerungsreaktion zu der PCR-Amplifikation gegeben wird, kann man auch einmal mit Phenol/Chloroform und einmal mit Chloro-

form vor der PCR-Amplifikation extrahieren. Ein Fünftel des Materials wurde in dem PCR-Amplifikationsanteil der TRAP-Reaktion verwendet (etwa 10 000 Zelläquivalente). Die Hälfte der TRAP-Reaktion wurde zur Analyse auf ein Gel geladen, so dass jede Spur in Fig. 25 Reaktionsprodukte von 5000 Zelläquivalenten repräsentiert. Extrakte von mit pGRN133 transfizierten Zellen waren hinsichtlich Telomerase-Aktivität positiv, während Extrakte von nicht-transfizierten Zellen (nicht gezeigt) oder mit dem Kontrollplasmid transfizierten Zellen kein Telomerase-Aktivität zeigten. Ähnliche Experimente mit RPE-Zellen ergaben das gleiche Ergebnis.

Rekonstitution in BJ-Zellen wurde auch mittels anderer hTERT-Konstrukte durchgeführt (d.h. pGRN145, pGRN155 und pGRN138). Die Rekonstitution unter Verwendung dieser Konstrukte schien zu einer stärkeren Telomerase-Aktivität zu führen im Vergleich zu mit pGRN133 transfizierten Zellen.

Der höchste Spiegel an Telomerase-Aktivität wurde mit pGRN155 erzielt. Wie bereits vorstehend diskutiert ist pGRN155 ein Vektor, der den späten Hauptpromotor von Adenovirus als ein Kontrollelement für die Expression von hTERT enthält und es zeigte sich, dass damit Telomerase-Aktivität rekonstituiert werden konnte bei Transfektion in BJ-Zellen. Bemerkenswerterweise ergab die Rekonstitution unter Verwendung mit dem hTERT-GFP-Fusionsprotein pGRN138 (das im Nucleus lokalisiert wird, siehe das nachstehende Beispiel 15) entweder in vitro (siehe Beispiel 7) oder mit in vivo-Rekonstitutionssystemen (Transfektion in BJ-Zellen), ergab Telomerase-Aktivität. Wenn in BJ-Zellen, wie beispielsweise vorstehend beschrieben, transfiziert wurde, war die Telomerase-Aktivität mit der vergleichbar, die sich aus der Rekonstitution mit pGRN133 oder pGRN145 ergab.

Ähnliche Ergebnisse wurden nach Transfektion von normalen menschlichen pigmenthaltigen retinalen Epithelzellen (RPE) mit den erfindungsgemässen hTERT-Expressionsvektoren erhalten. Es wird davon ausgegangen, dass die Seneszenz von RPE-Zellen zu der Erkrankung der mit dem Alter zusammenhängenden Macula-Degeneration führt oder dazu beiträgt. Gemäss den erfindungsgemässen Verfahren mit den erfindungsgemässen hTERT-Expressionsvektoren behandelte RPE-Zellen sollten eine verzögerte Seneszenz aufweisen im Vergleich zu unbehandelten Zellen und so von Nutzen sein bei Transplantations-therapien zur Behandlung oder zur Verhinderung der mit dem Alter zusammenhängenden Macula-Degeneration.

#### Beispiel 14

#### Promotor-Reporter-Konstrukt

Dieses Beispiel beschreibt die Konstruktion von Plasmiden, bei denen Reportergene mit stromaufwärts gelegenen hTERT-Sequenzen, die Promotorelemente enthalten, funktionell verknüpft sind. Diese Vektoren weisen zahlreiche Anwendungsmöglichkeiten auf, wozu die Identifizierung von in cis und trans wirkenden Regulationsfaktoren der Transkription in vivo und das Screening nach Agenzien, die die hTERT-Expression modulieren können (z.B. Aktivierung oder Hemmung) zählen (beispielsweise das Screenen von Wirkstoffen). Es können zwar eine Reihe von Reportergenen verwendet werden (beispielsweise Leuchtkörperchen-Luciferase,  $\beta$ -Glucuronidase,  $\beta$ -Galactosidase, Chloramphenicolacetyltransferase und GFP), für einleitende Experimente wurde jedoch die sezernierte menschliche alkalische Phosphatase (SEAP; Clontech) verwendet. Das SEAP-Reportergen codiert eine verkürzte Form des Enzym aus Plazenta, dem die Domäne für die Membran-Verankerung fehlt, wodurch die effiziente Sekretion des Proteins aus transfizierten Zellen ermöglicht wird. Es konnte gezeigt werden, dass die Spiegel an SEAP-Aktivität, die in dem Kulturmedium nachgewiesen werden, direkt proportional zu Veränderungen in intrazellulären Konzentrationen von SEAP-mRNA und -Protein sind (Berger et al., Gene 66 (1988), 1 und Cullen et al., Meth. Enzymol 216 (1992), 362).

Vier Konstrukte (pGRN148, pGRN150, „pSEAP2 basic“ (keine Promotorsequenz = negative Kontrolle) und „pSEAP2 control“ (das den frühen SV40-Promotor und Enhancer enthält) wurden in dreifacher Ausfertigung in sterblichen und unsterblichen Zellen transfiziert.

Plasmid pGRN148 wurde wie in Fig. 9 veranschaulicht konstruiert. Kurz zusammengefasst wurde ein BglII-Eco47III-Fragment von pGRN144 gespalten und in die BglII-NruI-Stelle von pSEAP2Basic (Clontech, San Diego, CA) cloniert. Ein zweiter Reporterpromotor, das Plasmid pGRN150, enthält die Sequenzen von dem in Beispiel 3 beschriebenen hTERT-Intron, um so regulatorische Sequenzen, die in dem Intron vorhanden sein können, verwenden zu können. Das Initiationscodon Met ist zu Leu mutiert, so dass das zweite dem Promotorbereich folgende ATG das Initiations-ATG des SEAP-ORF ist.

Die Konstrukte pGRN148 und pGRN150, die den hTERT-Promotor enthalten, wurden in sterbliche (BJ-Zellen) und unsterbliche (293)-Zellen transfiziert. Alle Transfektionen wurden parallel mit zwei Kontrollplasmiden durchgeführt. Ein Plasmid als negative Kontrolle (pSEAP basic) und ein Plasmid als positive Kontrolle („pSEAP control“, das den frühen SV40-Promotor und den SV40-Enhancer enthält).

In unsterblichen Zellen scheinen die Konstrukte pGRN148 und pGRN150 die SEAP-Expression genauso effizient zu steuern, wie die positive „pSEAP2 control“ (die den frühen SV40-Promotor und -Enhancer enthält). Im Gegensatz dazu ergab in sterblichen Zellen nur die „pSEAP2 control“ nachweisbare Aktivität. Diese Ergebnisse zeigen, dass, wie erwartet, hTERT-Promotorsequenzen in Tumorzellen-aktiv sind, jedoch nicht in sterblichen Zellen.

Ähnliche Ergebnisse wurden mit einer weiteren normalen Zelllinie (RPE), (pigmenthaltige, retinale Epi-

thelzelllinie) erhalten. In RPE-Zellen, die mit pGRN150 (das 2,2 kb an stromaufwärts gelegener genomischer Sequenz enthält) transfiziert sind, war der hTERT-Promotorbereich inaktiv, während das Plasmid «pSEAP2 control» aktiv war.

Wie bereits vorstehend angemerkt, sind Plasmide, bei denen Reportergene zur stromaufwärts gelegenen hTERT-Sequenz, die Promotorelemente enthalten, funktionell verknüpft sind, ausgesprochen nützlich für die Identifizierung und das Screening von Telomerase-Aktivität modulierenden Agenzien, wobei sowohl Verfahren der transienten als auch der stabilen Transfektion verwendet werden können. Bei einer Vorgehensweise werden beispielsweise stabile Transformanten von pGRN148 in Telomerase-negativen und Telomerase-positiven Zellen durch Cotransfektion mit einem eukariotischen selektierbaren Marker (wie z.B. neo) gemäss Ausubel et al., 1997, a.a.O.) hergestellt. Die erhaltenen Zelllinien werden dann für das Screenen von vermuteten Telomerase-modulierenden Agenzien verwendet, beispielsweise durch Vergleich der hTERT-Promotor-gesteuerten Expression in Gegenwart oder Abwesenheit einer Testverbindung.

Die erfindungsgemässen Promotor-Reporter-Vektoren (und andere) werden auch zur Identifizierung von in trans und in cis wirkenden Regulationselementen für die Transkription und Translation verwendet. Zu den Beispielen für in cis wirkenden regulatorischen Elementen der Transkription zählen Promotoren und Enhancer des Telomerasegens. Die Identifizierung und Isolierung von in cis und in trans wirkenden regulatorischen Agenzien führt zur Bereitstellung weiterer Verfahren und Reagenzien zur Identifizierung von Agenzien, die die Transkription und Translation von Telomerase modulieren.

Beispiel 15

#### Subzelluläre Lokalisation von hTERT

Ein Fusionsprotein mit hTERT und «enhanced green fluorescent protein» (EGFP; Cormack et al., Gene 173 (1996), 33)-Bereichen wurde wie nachstehend beschrieben konstruiert. Die EGFP-Einheit liefert ein nachweisbares «tag» oder Signal, womit das Vorhandensein oder die Lage des Fusionsproteins leicht bestimmt werden kann. Da EGFP-Fusionsproteine in den korrekten zellulären Kompartimenten lokalisiert sind, kann dieses Konstrukt zur Bestimmung der subzellulären Lage des hTERT-Proteins verwendet werden.

#### A. Konstruktion von pGRN138

Ein Vektor zur Expression eines hTERT-EGFP-Fusionsproteins in Säugerzellen wurde konstruiert durch Integration der EcoRI-Insertion von pGRN124 (siehe Beispiel 6) in die EcoRI-Stelle von pEGFP-C2 (Clontech, San Diego, CA). Die Aminosäuresequenz des Fusionsproteins ist nachstehend gezeigt. EGFP-Reste sind in Fettdruck, durch den 5'-untranslatierten Bereich von hTERT-mRNA codierte Reste sind unterstrichen und die hTERT-Proteinsequenz ist in normaler Schrift angegeben.

MVSKGEELFTGVVPILVELDGDVNGHKFSVSGEGEGDATYGKLTCLKFICTTGKLPVPWPT  
 LVTTLTLYGVQCFSRYPDHMKQHDFFKSAMPEGYVQERTIFFKDDGNYKTRAEVKFECDTL  
 VNRIELKGIDFKEDGNILGHKLEYNNSHNVYIMADKQKNGIKVNFKIRHNIEDGSVQLA  
 5 DHYQQNTPIGDPVLLPDNHYLSTQSALSKDPNEKRDHMLLEFVTAAGITLGMDELYKS  
 GRTQISSSSFEFAAASTORCVLLRTWEALAPATPAMPAPRCRAVRSLLRSHYREVLPLA  
 TFVRRLLGPQGWRLVQRGDPAAFRALVAQCLVCVPWDARPPPAAPSFRQVSLKELVARVL  
 10 QRLCERGAKNVLAFGFALLDGAAGPPEAFTTSVRSYLPNTVTDALRGSGAWGLLLRRVG  
 DDVLVHLLARCALFVLVAPSCAYQVCGPPLYQLGAATQARPPPHASGPRRRLGCERAWNH  
 SVREAGVPLGLPAPGARRRGGASRSLPLPKRPRRGAAPEPERTPVGQGSWAHPGRTRGP  
 SDRGFCVVSAPPAEEATSLEGALSGTRHSHPSVGRQHHAGPPSTSRPPRPWDTPCPCPVY  
 15 AETKHFYSSGDKEQLRPSFLLSSLRPSLTGARRLVETIFLGSRPWMPGTPRRLPLRPQR  
 YWQMRPLFLELLGNHAQCFYGVLLKTHCPLRAAVTPAAGVCAREKPGQSVAAPFEEEDTDP  
 RRLVQLLRQHSSPWQVYGFVRACLRRLVPPGLWGSRHNERFLRNTKKFISLGKHAKLSL  
 QELTWKMSVRDCAWLRRSPGVGCVPAAEHRLREEILAKFLHWLMSVYVVELLRSFFFYVTE  
 20 TTFQKNRLFFYRPSVWSKLQSIGIRQHLKRVQLRELSEAEVQRHREARPALTSRLRFIP  
 KPDGLRPIVNDYVVGARTFRREKRAERLTSRVKALFVNLNERARRPGLLGASVLGLDD  
 IHRAWRTFVLVRVRAQDPPPELYFVKVDVTGAYDTIPQDRLTEVIASIIKPONTYCVRRYA  
 VVQKAAHGHVRKAFKSHVSTLTDLPYMRQFVAHLQETSPLRDAVVIEQSSSLNEASSGL  
 25 FDVFLRFMCHHAVRIRGKSIVQCQIGPQGSILSTLLCSLCYGD MENKLFAGIRRDGLLLR  
 LVDDFLLVTPHLTHAKTFLRTLVRGVPEYGCVVNLKTVVNFVEDEALGCTAFVQMPAH  
 GLFPWCGLLLDTRTLEVQSDYSSYARTSIRASVTFNRGFKAGNMRRKLFGLVRLKCHSL  
 FLDLQVNSLQTVCTNIYKILLQAYRFHACVLQLPFHQVWKNPTFFLRVISDTASLCYS  
 30 ILKAKNAGMSLGAKGAAGPLPSEAVQWLCHQAFLLKLTRHRVTYVPLLGLSLRTAQTLQR  
 KLPGTTLTALEAAANPALPSDFKTILD

Weitere EGFP-Fusionskonstrukte wurden unter Verwendung einer partiellen (z.B. verkürzten) hTERT  
 35 codierenden Sequenz hergestellt, und, wie nachstehend beschrieben, zur Identifizierung von Aktivitäten  
 bestimmter Bereiche des hTERT-Polypeptids verwendet.

#### B. Nucleäre Lokalisierung und Verwendungsmöglichkeiten für DGRN138

40 Die Transfektion von NIH 293- und BJ-Zellen mit pGRN138 erlaubte die Bestätigung der nucleären  
 Lokalisation von rekombinant exprimierter hTERT. Zellen wurden mit pGRN138 (EGFP-hTERT) und einem  
 Kontrollkonstrukt (nur EGFP exprimiert) transfiziert. Die nucleäre Lokalisation der EGFP-hTERT ist in bei-  
 den Zelltypen offensichtlich (bestimmt durch Fluoreszenzmikroskopie). Wie bereits vorstehend ange-  
 merkt, unterstützt das pGRN138 hTERT-GFP-Fusionsprotein die Rekonstitution von Telomerase-Aktivität  
 45 sowohl in einem in vitro-Transkriptions/Translationssystem als auch in vivo, wenn es in BJ-Zellen trans-  
 fiziert wird.

hTERT-EGFP-Fusionsproteine (oder ähnliche nachweisbare Fusionsproteine) werden für eine Vielzahl  
 von Anwendungen verwendet. Beispielsweise wird das in diesem Beispiel beschriebene Fusionskon-  
 strukt oder ein EGFP-Konstrukt und eine verkürzte Form von hTERT zur Beurteilung der Fähigkeit von  
 50 hTERT und Varianten, in einen Zellnucleus einzutreten und/oder an die Chromosomenenden anlagern zu  
 können, verwendet. Ausserdem werden stabil oder transient mit pGRN138 transfizierte Zellen für das  
 Screenen nach vermuteten Telomerase-modulierenden Wirkstoffen oder Verbindungen verwendet.  
 Agenzien, die die nucleäre Lokalisation oder Telomer-Lokalisation stören, werden als Telomerase-Inhibi-  
 toren identifiziert. Für diesen Zweck sind Tumorzelllinien, die EGFP-hTERT stabil exprimieren, verwendet.  
 55 Potentielle Modulatoren von Telomerase werden diesen transfizierten Zellen verabreicht und die Lokali-  
 sation der EGFP-hTERT kann bewertet werden. Ausserdem werden FACS oder andere auf Fluoreszenz  
 basierende Verfahren verwendet, um hTERT exprimierende Zellen selektieren zu können, womit homoge-  
 ne Populationen für das Screenen von Wirkstoffen bereitgestellt werden, insbesondere wenn die tran-  
 siente Transfektion von Zellen angewandt wird.

60 Bei anderen Anwendungen können Bereiche der hTERT zur Identifikation von Bereichen (z.B. Reste  
 193-196 (PRRR) und Reste 235-240 (PKRRRR)) mutagenisiert werden, die für die nucleäre Lokalisati-  
 on erforderlich sind, wobei diese Bereiche Ziele für anti-Telomerase-Wirkstoffe (Modulatoren von Telo-  
 merase-Aktivität) sind. Zu den weiteren Anwendungen gehören:

65 Verwendung des Fusionsproteins als Fluoreszenzmarker für die effiziente Zelltransfektion, sowohl für

Experimente hinsichtlich transienter Transfektion als auch für die Etablierung EGFP-hTERT-exprimierender stabiler Zelllinien;

Expression eines hTERT-EGFP-Fusionsproteins mit mutierten Signalen für nucleäre Lokalisation (defizient für nucleäre Lokalisation) in unsterblichen Zellen, damit das hTERT-Mutanten-EGFP alle hTERT der unsterblichen Zellen einfängt, sie im Cytoplasma zurückhält und die Telomer-Aufrechterhaltung verhindert;

Das GFP kann auch als ein «tag» für Immunpräzipitation verwendet werden.

#### Beispiel 16

#### Die Auswirkung einer Mutation auf eine katalytische Aktivität von Telomerase

Dieses Beispiel beschreibt Experimente hinsichtlich der Veränderung von hTERT-Aminosäuren, sowie die Auswirkung von Aminosäureaustauschen in hTERT auf katalytische Aktivität von Telomerase. Der Austausch von Aminosäuren und im Anschluss daran die funktionelle Analyse ist ein Standardverfahren zur Bewertung der Bedeutung und Funktion einer Polypeptidsequenz. Dieses Beispiel zeigt, dass Veränderungen in den reverse-Transkriptase (RT)- und Telomerase-T-Motiven katalytische Aktivität von Telomerase beeinflussen und es liefert eine zusätzliche Bestätigung der katalytischen Natur des hTERT-Polypeptids.

Die übliche Nomenklatur wird zur Beschreibung der Mutanten verwendet: Der Zielrest im nativen Molekül (hTERT) wird durch den Ein-Buchstaben-Code und die Position angegeben, und der entsprechende Rest in dem Mutantenprotein ist durch den Ein-Buchstaben-Code angegeben. Somit kennzeichnet beispielsweise der Ausdruck «K626A» eine Mutante, bei der das Lysin an Position 626 (d.h. im Motiv 1) von hTERT gegen ein Alanin ausgetauscht ist.

#### A) Mutagenese des FFYxTE-Motivs von hTERT

In einleitenden Experimenten wurde ein mutiertes hTERT-Protein codierender Vektor, «F560A» hergestellt, bei dem die Aminosäure 560 von SEQ. ID. Nr. 2 von Phenylalanin (F) zu Alanin (A) durch ortsgerichtete Mutagenese von pGRN121 mittels Standardverfahren geändert wurde. Diese Mutation unterbricht das TRT FFYxTE-Motiv. Es konnte gezeigt werden, dass das erhaltene mutierte F560A-Polynucleotid die Synthese eines hTERT-Proteins mit vollständiger Länge steuert, wie dies unter Verwendung eines zellfreien Reticulocytenlysat-Transkriptions/Translationssystem in Gegenwart von <sup>35</sup>S-Methionin bestimmt werden konnte.

Bei Translation des mutierten Polypeptids zusammen mit hTERT, wie in Beispiel 7 beschrieben, wurde mittels des TRAP-Assays unter Verwendung von 20 PCR-Cyclen keine Telomerase-Aktivität entdeckt, während die Kontroll-Cotranslation von hTERT-hTERT-Aktivität rekonstituierte. Bei Verwendung von 30 PCR-Cyclen im TRAP-Assay war Telomerase-Aktivität mit der mutierten hTERT nachweisbar, sie war jedoch beträchtlich geringer im Vergleich zu der Kontroll (Wildtyp)-hTERT.

#### B) Zusätzliche ortsgerichtete Mutagenese von hTERT-Aminosäureresten

Konservierte Aminosäuren in sechs RT-Motiven wurden zu Alanin abgeändert, um ihren Beitrag zur katalytischen Aktivität zu beurteilen, wobei Standardverfahren für die ortsgerichtete Mutagenese verwendet wurden (siehe beispielsweise Ausubel, a.a.O.). Die Mutanten wurden mittels IVR-Telomerase untersucht, wobei der in Beispiel 7 ausführlich beschriebene Zwei-Schritt-Assay (üblich/TRAP) verwendet wurde.

Die Mutanten K626A (Motiv 1), R631A (Motiv 2), D712A (Motiv A), Y717A (Motiv A) und D868A (Motiv C) zeigten stark herabgesetzte oder nicht-nachweisbare Telomerase-Aktivität, während die Mutanten Q833A (Motiv B) und G932A (Motiv E) mittlere Aktivitätsspiegel aufwiesen. Zwei Mutationen ausserhalb der RT-Motive (R688A und D897A) zeigten Aktivität, die äquivalent zu der Aktivität von Wildtyp-hTERT war. Diese Ergebnisse waren konsistent mit analogen Mutationen in reverser Transkriptase (Joyce et al., Ann. Rev. Biochem. 63 (1994), 777), und ähnlich zu dem mit Est2P erhaltenen Ergebnissen (siehe Lingner, Science 276 (1997), 561). Durch diese Experimente konnten Reste in den RT-Motiven identifiziert werden, die für enzymatische Aktivität kritisch sind. Diese Experimente zeigen auch das hTERT, das das katalytische Protein von menschlicher Telomerase ist. Durch die Mutationen werden hTERT-Polypeptidvarianten erzeugt, die als dominant-negative Regulatoren von Telomerase-Aktivität verwendet werden können.

Durch Aminosäureausrichtung der bekannten TRTs konnte das Telomerase-spezifische Motiv T (siehe vorstehend) identifiziert werden. Um die katalytische Rolle dieses Motivs in hTERT zu bestimmen, wurde eine Deletion von sechs Aminosäuren in diesem Motiv (Δ560–565; FFYxTE) unter Verwendung von Standardverfahren für die ortsgerichtete Mutagenese konstruiert (Ausubel, a.a.O.). Die Deletion wurde unter Verwendung von IVR-Telomerase mittels in Beispiel 7 ausführlich beschriebener Zwei-Schritt-Assays (üblich/TRAP) untersucht. Die Mutante Δ560–565 zeigte keine nachweisbare Telomerase-Aktivität nach 25 PCR-Cyclen, während Wildtyp-hTERT-IVR-Telomerase in starkes Signal erzeugte. Jeder

Aminosäurerest in Motiv T wurde auf ähnliche Weise unabhängig untersucht. Die Mutanen FS60A, Y562A, TS64 und E565A behielten mittlere Spiegel an Telomerase-Aktivität bei, während die Kontrollmutante F487A eine minimale Auswirkung auf die Aktivität hatte. Bemerkenswerterweise zeigte die Mutante F561A eine stark herabgesetzte oder nicht nachweisbare Telomerase-Aktivität, während in ihrer «Revertante» F561A561P Aktivität voll wiederhergestellt war. Bei der F561A561F befindet sich an der mutierten Position wieder das ursprüngliche Phenylalanin. Dies stellt eine Kontrolle dar, die zeigt, dass keine weiteren Aminosäureaustausche in dem Plasmid vorkamen, die die beobachtete verringerte Aktivität hätten erklären können. Somit ist das T-Motiv das erste Nicht-RT-Motiv, für das gezeigt werden konnte, dass es für Telomerase-Aktivität erforderlich ist.

Motiv T ist von Nutzen für die Identifizierung von TRTs von anderen Organismen und als ein potentieller dominant/negativ-Regulator von Telomerase-Aktivität. Im Gegensatz zu den meisten anderen RTs assoziierte Telomerase stabil mit einem kleinen Anteil einer einzelnen RNA (d.h. hTR) und kopiert diesen prozessiv, somit könnte das Motiv T an der Vermittlung der hTR-Bindung, der Prozessivität der Reaktion oder anderen Funktionen beteiligt sein, die für die Telomerase-RT einzigartig sind.

#### Beispiel 17

Screenen nach Modulatoren von Telomerase-Aktivität mittels rekombinant exprimierter Telomerase-Bestandteile

In diesem Beispiel wird die Verwendung von in vitro-rekonstituierter Telomerase zum Screenen und zur Identifizierung von Modulatoren von Telomerase-Aktivität beschrieben. Der beschriebene Assay kann leicht für Verfahren mit hohem Durchsatz adaptiert werden (z.B. mittels Platten mit vielfachen Vertiefungen und/oder Robotertechniksystem). Für den Fachmann sind die zahlreichen Variationsmöglichkeiten hinsichtlich der Assayschritte offensichtlich.

Rekombinante Clone für Telomerase-Bestandteile (z.B. hTERT und hTRR) werden in einer in vitro-Reaktion wie folgt und in dem vorstehend beschriebenen Beispiel 7 mittels des TNT® T7gekoppelten Reticulocytenlysats-Systems (Promega; das in US-Patent Nr. 5 324 637 beschrieben ist und gemäss den Angaben des Herstellers verwendet wurde) transkribiert und translatiert (nur hTERT):

Reagenz	Menge pro Reaktion (µl)
TNT-Kaninchen-Reticulocytenlysats	25
TNT-Reaktionspuffer	2
TNT T7-RNA-Polymerase	1
AA-Gemisch (vollständig)	1
«Prime» RNase-Inhibitor	1
Nuclease-freies Wasser	16
XbaI-geschnittenes pGRN121 (hTERT, 0,5 µg)	2
FspI-geschnittenes pGRN164 (hTR, 0,5 µg)	2

Die Reaktion wird 2 Stunden bei 30°C inkubiert. Danach wird das Produkt auf einem «ultrafree-MC» DEAE-Filter (Millipore) gereinigt.

Das rekombinante Telomerase-Produkt (IVRP) wird in Gegenwart oder Abwesenheit vielfacher Konzentrationen an Testverbindungen, die in DMSO (z.B. 10 µM bis 100 µM) solubilisiert wurden, untersucht. Die Testverbindungen werden 30 Minuten bei Raumtemperatur in einem Gesamtvolumen von 25 µl vorinkubiert, in der Gegenwart von 2, 5 µl IVRP, 2,5% DMSO und 1 × TRAP-Puffer (20 mM Tris-HCl, pH-Wert 8,3, 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 63 mM KCl, 0,05% Tween 20, 1,0 mM EGTA und 0,1 mg/ml Rinderserumalbumin) vorinkubiert. Nach der Vorinkubation werden zu jeder Probe 25 µl TRAP-Assay-Reaktionsgemisch zugegeben. Das TRAP-Assay-Reaktionsgemisch besteht aus 1 × TRAP-Puffer, 50 µl dNTP, 2,0 µg/ml Primer ACX, 4 µg/ml Primer U2, 0,8 Attomol/ml TSU2, 2 Einheiten 50 µl Taq-Polymerase (Perkin Elmer) und 2 µg/ml [<sup>32</sup>P]5'-endmarkierter Primer TS (3000 Ci/mMol). Die Röhrchen mit dem Reaktionsgemisch werden dann in den PCR-Thermocycler (MJ Research) gestellt und die PCR wird wie folgt durchgeführt: 60 Minuten bei 30°C, 20 Cyclen von jeweils 30 Sekunden bei 94°C, 30 Sekunden bei 60°C und 30 Sekunden bei 72°C, dann 1 Minute bei 72°C und Abkühlen auf 10°C. Der TRAP-Assay ist, wie bereits vorstehend erwähnt, in dem US-Patent Nr. 5 629 154 beschrieben. Die verwendeten Primer und Substrate haben die Sequenzen:



TS-Primer (5'-AATCCGTCGAGCAGAGTT-3');

ACX-Primer (5'-GCGCGG[CTTACC]3CTAACC-3');

U2-Primer (5'-ATCGCTTCTCGGCCTTTT-3');

TSU2 (5'-AATCCGTCGAGCAGAGTTAAAAGCCCGAGAAGCGAT-3')

Nach Beendigung des PCR-Schritts werden zu jedem Reaktionsröhrchen 4 µl 10 × Bromphenolblau enthaltender Auftragspuffer zugegeben und die Produkte (20 µl) auf einem 12,5%igen nicht-denaturierenden PAGE-Gel in 0,5 × TBE bei 400 V laufen gelassen. Nach Beendigung des Gellaufs wird das Gel getrocknet und die TRAP-Produkte werden mittels des «Phosphorimager» oder durch Autoradiographie sichtbar gemacht. Die Telomerase-Aktivität in Gegenwart der Testverbindung wird dadurch gemessen, dass der Einbau der Markierung in das Reaktionsprodukt mit einer Parallelreaktion ohne das Agens verglichen wird.

Die folgenden in den Beispielen beschriebenen Clone wurden bei der American Type Culture Collection, Rockville, MD20852, USA hinterlegt.

Lambda-Phage λ 25-1.1	ATCC-Zugangsnummer 209024
pGRN121	ATCC-Zugangsnummer 209016
Lambda-Phage λGφ5	ATCC-Zugangsnummer 98505

Diese Hinterlegungen unter dem Budapester Vertrag erfolgten für ATCC 209024 am 12. Mai 1997, für ATCC 209016 am 6. Mai 1997 und für ATCC 98505 am 14. August 1997.

Die vorliegende Erfindung stellt neue Verfahren und Substanzen zur Diagnose und der Behandlung von mit Telomerase in Zusammenhang stehenden Krankheiten bereit. Es wurden spezifische Beispiele bereitgestellt, die vorstehende Beschreibung dient jedoch nur zur Veranschaulichung und soll keine Einschränkung darstellen. Für den Fachmann sind nach Lesen der Beschreibung viele Variationsmöglichkeiten hinsichtlich der Erfindung offensichtlich. Der Umfang der Erfindung wird somit nicht durch die vorstehende Beschreibung bestimmt, sondern soll durch die nachstehenden Patentansprüche zusammen mit dem vollen Umfang ihrer Äquivalente bestimmt werden.

Alle in dieser Anmeldung zitierten Publikationen und Patentdokumente sind aufgrund der Bezugnahme und für alle Zwecke als Bestandteil der Beschreibung anzusehen und zwar in dem gleichen Ausmass als wenn jede einzelne Veröffentlichung oder jedes einzelne Patentdokument individuell bezeichnet worden wäre.

#### Patentansprüche

1. Menschliches Telomerase-reverse Transkriptase-(hTERT-) Polypeptid oder eine Variante davon oder ein Fragment davon, wobei das Polypeptid oder die Variante davon oder das Fragment davon mindestens eine der mit nativer hTERT assoziierten funktionellen Aktivitäten aufweist und die oder diese Aktivitäten aus der Gruppe ausgewählt sind, die besteht aus:

- der Aktivität, die einem DNA-Primer oder ein Substrat um mindestens einen TTAGGG-Repeat verlängert, d.h. der katalytischen Aktivität von Telomerase,
- der Aktivität von konventioneller reverser Transkriptase,
- der Aktivität, die exogene RNA transkribiert,
- der nukleolytischen Aktivität,
- der primer- oder substratbindenden Aktivität,
- der proteinbindenden Aktivität,
- der Aktivität, die die RNA menschlicher Telomerase (hTR) bindet.

2. hTERT-Polypeptid oder Variante davon oder Fragment davon nach Anspruch 1, mit mindestens 75% Sequenzidentität zu dem hTERT-Polypeptid SEQ. Id. Nr. 2.

3. hTERT-Polypeptid nach Anspruch 1, mit der Sequenz von SEQ. Id. Nr. 2 und mit vollständiger Länge.

4. hTERT-Polypeptid nach einem der Ansprüche 1 bis 3, wobei das Polypeptid oder die Variante oder das Fragment davon katalytische Aktivität von Telomerase haben.

5. Zusammensetzung, umfassend ein hTERT-Polypeptid nach einem der Ansprüche 1 bis 4 und eine RNA.

6. Zusammensetzung nach Anspruch 5, wobei die RNA eine menschliche Telomerase-RNA ist.

7. Zusammensetzung nach Anspruch 6, wobei das hTERT-Polypeptid und die menschliche Telomerase-RNA einen Ribonukleoproteinkomplex mit einer Telomerase-Aktivität bilden.

8. Nukleinsäuresequenz, die ein hTERT-Polypeptid oder ein Fragment davon nach Anspruch 1 codiert.
9. Nukleinsäuresequenz nach Anspruch 8, die ein hTERT-Polypeptid codiert, wobei das hTERT-Polypeptid eine wie in SEQ. Id. Nr. 2 angegebene Aminosäuresequenz hat, oder eine Sequenz, die eine oder mehrere konservative Substitutionen in der Aminosäuresequenz umfasst.
10. Nukleinsäuresequenz, die ein hTERT-Polypeptid nach Anspruch 3 codiert.
11. Nukleinsäuresequenz nach Anspruch 10, umfassend die das hTERT-Polypeptid codierende Sequenz des Einschubs von pGRN121 (ATCC-Zugangsnummer 209016).
12. Nukleinsäuresequenz nach Anspruch 10, mit der in Fig. 16 (SEQ. Id. Nr. 1) gezeigten Sequenz.
13. Nukleinsäuresequenz nach Anspruch 8, die die Sequenz von SEQ. Id. Nr. 1 aufweist.
14. Nukleinsäuresequenz nach Anspruch 8, die unter stringenten Bedingungen mit einer Nukleinsäuresequenz hybridisiert, die exakt komplementär zur Sequenz von SEQ. Id. Nr. 1 ist.
15. Polynukleotid, umfassend eine Nukleinsäuresequenz nach einem der Ansprüche 8 bis 14.
16. Nukleinsäuresequenz, die exakt oder fast exakt komplementär zur Nukleinsäuresequenz nach einem der Ansprüche 8 bis 14 ist.
17. Polynukleotid, umfassend eine Nukleinsäuresequenz nach Anspruch 16.
18. Polynukleotid nach Anspruch 15 oder 17, umfassend eine mit der hTERT-Polypeptid codierenden Nukleinsäuresequenz funktionell verknüpfte Promotorsequenz.
19. Ein im wesentlichen reines Polynukleotid nach Anspruch 15 oder 17, das eine Länge von mindestens 10 Nukleotiden hat und eine aufeinanderfolgende Sequenz von mindestens 12 Nukleotiden umfasst, die zu einer aufeinanderfolgenden Sequenz in einem natürlich vorkommenden hTERT-Gen oder einer hTERT-mRNA identisch oder genau komplementär ist.
20. Polynukleotid nach Anspruch 19, mit mindestens 15 aufeinanderfolgenden Nukleotiden.
21. Polynukleotid nach Anspruch 19, mit mindestens 25 aufeinanderfolgenden Nukleotiden.
22. Nukleinsäuresequenz oder Polynukleotid nach einem der Ansprüche 8 bis 15, die/das zu der zusammenhängenden Sequenz in einem natürlich vorkommenden hTERT-Gen oder einer hTERT-mRNA identisch ist.
23. Nukleinsäuresequenz oder Polynukleotid nach Anspruch 16 oder 17, die/das zu der zusammenhängenden Sequenz in einem natürlich vorkommenden hTERT-Gen oder einer hTERT-mRNA genau komplementär ist.
24. Expressionsvektor, der eine Nukleinsäuresequenz oder ein Polynukleotid nach einem der Ansprüche 8 bis 23 umfasst.
25. Ex vivo-Zelle oder -Zelllinie, die mit einer Nukleinsäuresequenz oder einem Polynukleotid nach einem der Ansprüche 8 bis 23 transfiziert ist.
26. Zelle nach Anspruch 25, die eine menschliche Zelle ist.
27. Zelle nach Anspruch 25 oder 26, die eine erhöhte Proliferationskapazität hat im Vergleich zu einer Zelle, die zwar ansonsten identisch ist, jedoch die Nukleinsäuresequenz oder das Polynukleotid nicht enthält.
28. Antikörper oder Fragment davon, die an ein hTERT-Polypeptid nach einem der Ansprüche 1 bis 4 spezifisch binden.
29. Ex vivo-Zelle, die den Antikörper nach Anspruch 28 sezernieren kann.
30. Verfahren zur Untersuchung, ob eine Verbindung ein Modulator einer Telomerase-reverse Transkriptase-Aktivität oder einer hTERT-Expression ist, umfassend das Inkontaktbringen einer ex vivo-Zelle, eines Zellextraktes oder einer Zusammensetzung enthaltend ein hTERT-Polypeptid nach Anspruch 1 oder ein Polynukleotid nach Anspruch 15 mit der Verbindung und den Nachweis einer Veränderung in der Telomerase-reverse Transkriptase-Aktivität oder hTERT-Expression in der ex vivo-Zelle, dem Zellextrakt oder der Zusammensetzung.
31. Verfahren zur Untersuchung, ob eine Testverbindung ein Modulator einer Telomerase-reverse Transkriptase-Aktivität ist, wobei das Verfahren folgende Schritte umfasst:
  - a) Bereitstellung eines Polypeptides nach einem der Ansprüche 1 bis 4;
  - b) Inkontaktbringen des Polypeptides mit der Testverbindung; und
  - c) Messung der Aktivität des hTERT-Polypeptides, wobei eine Veränderung in der Telomerase-reverse Transkriptase-Aktivität, die in Gegenwart der Testverbindung gemessen wurde, im Vergleich zu der Aktivität in Abwesenheit der Testverbindung einen Nachweis dafür liefert, dass die Testverbindung die Telomerase-reverse-Transkriptase-Aktivität moduliert.
32. Verfahren zur Herstellung rekombinanter Telomerase nach einem der Ansprüche 1 bis 4, das die Züchtung einer Zelle nach Anspruch 26 oder 27 und die Isolierung des Polypeptides aus der Kultur umfasst.
33. Verfahren nach Anspruch 32, das ferner das Inkontaktbringen des rekombinanten hTERT-Polypeptides mit einem Telomerase-RNA-Bestandteil umfasst, unter solchen Bedingungen, dass das rekombinante Polypeptid und der Telomerase-RNA-Bestandteil zur Bildung eines Telomerase-Enzyms assoziieren, das die Anfügung von Nukleotiden an ein Telomerasesubstrat katalysieren kann.
34. Verfahren zum Nachweis eines hTERT-Genproduktes in einer biologischen Probe, umfassend:
  - a) Inkontaktbringen der biologischen Probe mit einer Sonde, die spezifisch an das hTERT-Genprodukt hybridisiert, wobei die Sonde und das Genprodukt einen Komplex bilden, und Nachweis des Komplexes; oder

b) spezifische Amplifikation des Genproduktes in der biologischen Probe, und Nachweis des Amplifikationsproduktes, wobei die Anwesenheit des Komplexes oder des Amplifikationsproduktes mit dem Vorhandensein des hTERT-Genproduktes in der biologischen Probe korreliert ist, und wobei das Genprodukt ein Polynukleotid nach Anspruch 15 oder 17 ist.

5 35. Verfahren zum Nachweis eines hTERT-Polypeptids nach Anspruch 1 in einer biologischen Probe, umfassend:

Inkontaktbringen der biologischen Probe mit einer Sonde, die spezifisch das hTERT-Polypeptid bindet, wobei die Sonde und das hTERT-Polypeptid einen Komplex bilden, und Nachweis des Komplexes, wobei die Anwesenheit des Komplexes mit dem Vorhandensein des hTERT-Polypeptides in der biologischen Probe korreliert ist.

10 36. Verfahren nach Anspruch 35, dadurch gekennzeichnet, dass die Sonde ein monoklonaler Antikörper ist.

37. Verfahren zum Nachweis des Vorhandenseins von mindestens einer telomerase-positiven menschlichen Zelle in einer, menschliche Zellen nach Anspruch 23 enthaltenden biologischen Probe, wobei das Verfahren die folgenden Schritte umfasst:

15 a) Bestimmung der Menge an hTERT-Genprodukt in der Probe,  
b) Vergleich der gemessenen Menge mit einer Kontrolle, die mit einer keine telomerase-positiven Zellen enthaltenden Probe korreliert,

wobei das Vorhandensein eines höheren Spiegels des hTERT-Genproduktes in der Probe im Vergleich zu der Kontrolle mit dem Vorhandensein von telomerase-positiven Zellen in der biologischen Probe korreliert ist.

38. Verfahren nach Anspruch 37, wobei die telomerase-positiven Zellen Krebszellen sind.

39. Verfahren zur Diagnose eines mit Telomerase in Zusammenhang stehenden Zustands an einer Zellprobe oder Gewebeprobe eines Patienten, umfassend:

25 a) Bestimmung der Menge an hTERT-Genprodukt in der Probe,  
b) Vergleich der Menge an hTERT-Genprodukt in der Probe mit der Menge in einer gesunden Zelle des gleichen Typs, wobei eine sich von der Menge in der gesunden Zelle unterscheidende Menge an hTERT-Genprodukt in der Probe ein diagnostisches Anzeichen für einen mit Telomerase in Zusammenhang stehenden Zustand ist, wobei das Genprodukt ein Polynukleotid nach Anspruch 15 ist.

30 40. Kit zum Nachweis eines hTERT-Gens oder -Genproduktes, wobei der Kit eines oder mehrere Reagenzien enthält, die aus der Gruppe ausgewählt sind, die aus den Polynukleotiden nach Anspruch 15 oder 17, den Polypeptiden nach einem der Ansprüche 1 bis 7 und dem Antikörper oder Fragment davon nach Anspruch 28 besteht.

41. Verfahren zur Steigerung der Proliferationskapazität einer Vertebratenzelle ex vivo, dadurch gekennzeichnet, dass die Expression von hTERT nach Anspruch 1 in der Zelle gesteigert wird.

42. Verfahren zur Steigerung der Proliferationskapazität einer Vertebratenzellen ex vivo durch Einführung eines rekombinanten Polynukleotids in die Zelle, wobei das Polynukleotid eine, ein hTERT-Polypeptid nach Anspruch 1 codierende Sequenz umfasst und wobei die Sequenz mit einem Promotor funktionell verknüpft ist.

40 43. Verfahren nach Anspruch 42, wobei das hTERT-Polypeptid die Sequenz des hTERT-Polypeptids aufweist, das durch pGRN121 (ATCC-Zugangsnummer 209016) codiert wird.

44. Arzneimittel, umfassend ein Molekül ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus den hTERT-Polypeptiden nach einem der Ansprüche 1 bis 4, dem Polynukleotid nach Anspruch 15, das ein hTERT-Polypeptid codiert, und dem Antikörper oder Fragment davon nach Anspruch 28.

45 45. Arzneimittel, umfassend einen Inhibitor der Telomerase-Aktivität, gegebenenfalls in Kombination mit einem pharmazeutisch verträglichen Träger, wobei der Inhibitor ein hTERT-Polypeptid nach Anspruch 1, ein hTERT-Antikörper nach Anspruch 28 oder ein hTERT-Polynukleotid nach Anspruch 15 oder 17 ist.

46. Die Verwendung eines Inhibitors von Telomerase-Aktivität zur Herstellung eines Medikaments zur Behandlung eines Zustands, der mit einem erhöhten Spiegel an Telomerase-Aktivität innerhalb einer menschlichen Zelle assoziiert ist, wobei dieser Inhibitor:

50 a) ein Polypeptid nach Anspruch 1 mit einer Aminosäuresequenz ist, die zu einer aufeinanderfolgenden Sequenz von mindestens sechs Aminosäuren in hTERT identisch ist;

b) ein hTERT-bindender Antikörper ist;

55 c) ein Polynukleotid mit einer Nukleotidsequenz ist, die zu einer aufeinanderfolgenden Sequenz von mindestens 12 Nukleotiden in einer hTERT-codierenden Sequenz identisch oder komplementär ist; oder

d) eine Verbindung, die durch ein Screening identifiziert wurde, das das Inkontaktbringen einer Testverbindung mit einem Polypeptid mit einer Aminosäuresequenz umfasst, die mit einer aufeinanderfolgenden Sequenz von mindestens sechs Aminosäuren in hTERT identisch ist.

47. Die Verwendung des Proteins nach einem der Ansprüche 1 bis 4, des Polynukleotids nach Anspruch 15 oder 17, oder des Antikörpers oder Fragments nach Anspruch 28 zur Herstellung eines Medikaments zur Hemmung von Krebs oder von Altersbeschwerden.

48. Verwendung eines Polynukleotides, das mindestens 6 Basen lang und genügend komplementär zu SEQ. Id. Nr. 1 ist, um mit letzterer zu hybridisieren, als Primer in der Amplifikation der Polynukleotide nach Anspruch 15 oder 17.

65 49. Verwendung nach Anspruch 48, worin das Polynukleotid mindestens 15 Basen lang ist.

50. Verwendung nach Anspruch 48, worin das Polynukleotid mindestens 25 Basen lang ist.

51. Verwendung eines Polynukleotides, das mindestens 10 Basen lang ist und an SEQ. Id. Nr. 1 oder sein Komplement hybridisiert, als Sonde zum Nachweis des Polynukleotides nach Anspruch 15 oder 17.

5 52. Verwendung nach Anspruch 51, worin das Polynukleotid mindestens 20 Basen lang ist.

53. Verwendung nach Anspruch 51, worin das Polynukleotid markiert ist und die Markierung das nachweisbare Signal liefert.

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

Figur 1

Motiv 0

humanes	AKFLHWLMSVYVVELLRSPFYVTETTFQKNR
te21	ISEIEWLVLGKRSNAXHCLSDFEKRRQIFAEPYIYWLNSPIIPILQSFFYITESSDLRNR
EST2	LKDFRWLFISD---IWFTKHNFFENLNQLAICFISWLPRLIPKIIQTFFYCTEISSTVT-
p123	TREISWQVET-SAKHPYYFDHEN-IYVLWKLLRWIFEDLVVSLIRCFFYVTEQQKSYSK

\* . . . . . \* \* \*

Motiv 1

humanes	LFFYRKSVHSLQSIGIRQHLKRVQLRDVSEAEVRQHRREARPAALLTSRLRFIPKP--DGL
te21	TVYFRKDIWKLLCRPPI-TSMKHEAFKINENNVRMDTQK-TTLPPAVIRLLPKK--RTP
EST2	IVYFRHDTWNKLITPFIYFYKTYLVENNVCRNHNSTLS--RPNHSHKRIIPKKSNEF
p123	TYYYRKNIHDVINKMSI-ADLKKETLAEVQSEKVBWKKK-LGFAPGKLRLIPKK--TTF

\* . . . . . \* \* \*

Motiv 2

humanes	RPIVNHDTVVGARTFRREKRAERLTSRVKALP-SVLNYERA
te21	RLITN-LRKRFLIKHGSNKKMLVSTNQTLRPVASILKHLINEESSGIPFNLEVYHKLLTF
EST2	RIIAIPCRGADEEEFTIYKENHKMAIQPTQKILEYLRNKRPTSFTKIYSPTQIADRIKEF
p123	RPIMTFNKKIVNSDRKTTKLTNTKLLNSHMLKTLKN-RMFKDPPGPAVFNYDDVMKKY

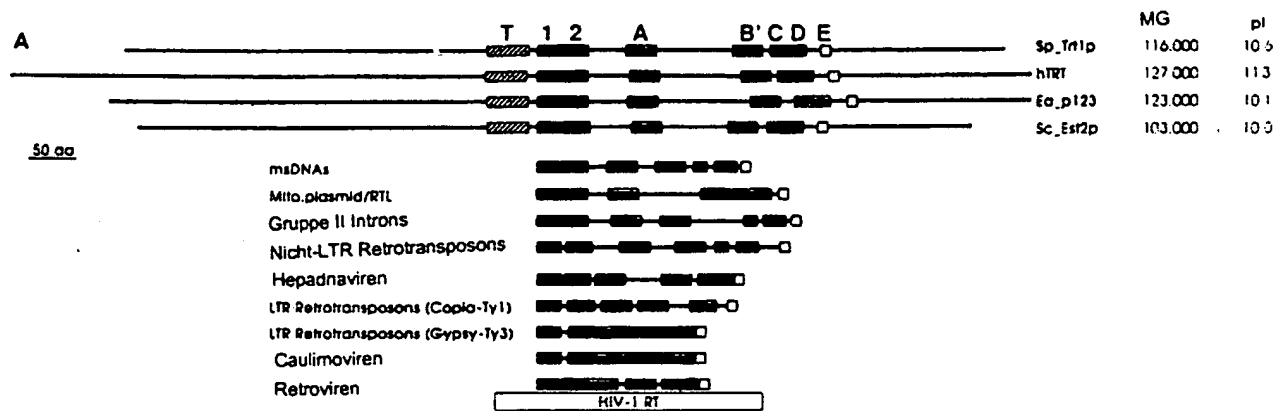
\* . . . . . \* \* \*

Motiv 3 (A)

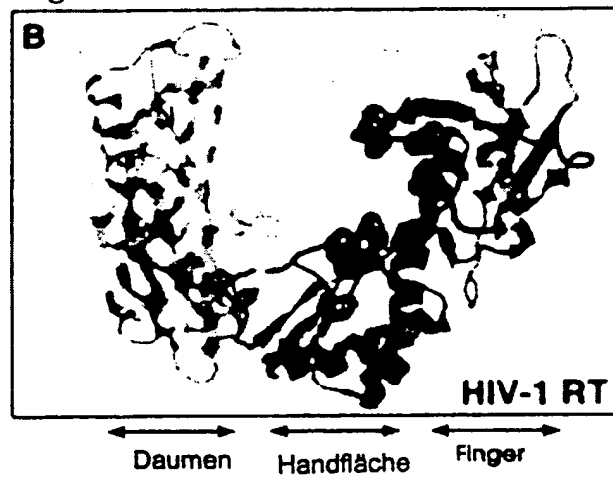
te21	KKDLLKHRMFOR-KXYFVRIDIKSCYDRIKQDLHFRIVKK-KLKDPEPVIRKYATIHATG
EST2	KQRLKKFNNVLPELYFMKFDVKSCYDSIPRMECHRILKD-ALKNENGFFVRSQYFFNTN
p123	IEFVCKWKQVGQPKLPFATHDIEKCYDSVNRKLSIFLTKTKLLSSDFWIHTAQILKRKY

\* . . . . . \* \* \*

Figur 2



Figur 3



figur 4

C

Motif T		
TRT con	WL	hh hh pFFY TE p p Y RK W L h I K
Sp_Trt1p	429	WLYNSFIIPILQSFYITESSDLRNRTVYFRKDINKLLRPFITSMKK 8
hTBT	546	WLMVYVVELLSFYVTEFTTFQKNLFFYRKSVMSKLSIGIRHLK 10
Ea_p123	441	WIFEDLVSLIRCFYVTEQOKSYKTYTYRKNIWDVIMKMSIADLKK 8
Sc_Est2p	366	WLFROLIPKIIQTFFYCTEISSTVT-IVYFRNDTWNKLTTPFIVEYFK 8

Motif 1			Motif 2			Motif A		
TRT con	h	hRhIPKK p	FRhI	h	h	PcLYTh hDh	CYD I	hNk K
Sp_Trt1p	NNVRMDTOKTTLPPAVIRLLPKONT-	0	FRITNLRKRFLIKMGSNKUMLVSTNQT	40	FGKKYFVRIDIKSCYDRIKQDLHFRIVKKKKLD	82		
hTBT	EVROHREARPAALLTSRLRFIPKPG-	0	LAPIVNMDYVVGARTFRREKRAERLTSRV	45	PPPELYFVKVDVTGAYDTIPQDRLTEVIASIIKP	87		
Ea_p123	KEVEENKXSLGFAPCKLRILIPKTT-	0	FRPIMTFNKKIVNSDKTTKLTNTNKLIN	41	GQPKLFPATHDIEKCYDSVNREKLTSTFLKTTKLL	100		
Sc_Est2p	CRHNHNSYTLNPNHSMRIIPKSN	1	FRIIAIPCRGADEEFTIYKENHKNAIOP	42	VLPFLYFNKFDVKSCYDSIPRMECHRIKDALIN	62		

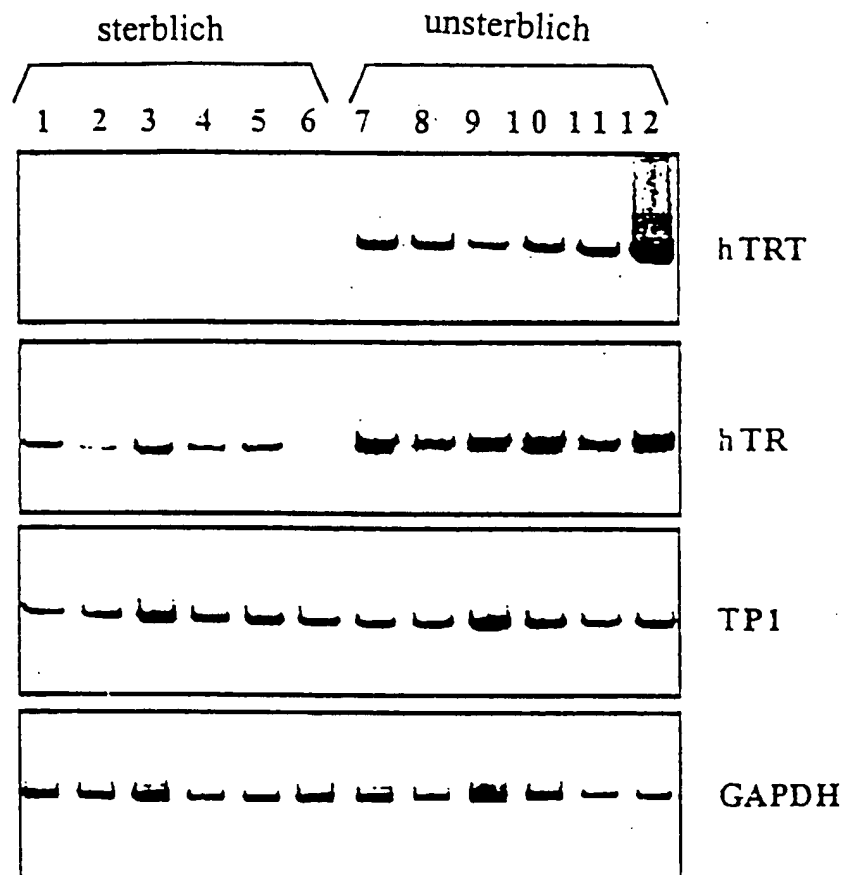
Motif B'			Motif C			Motif D			Motif E		
TRT con	K Y Q	GIPOGS LS HL h Y DI F	LLPL	DDFLHIT	A F	h G c p N c K	W G S				
Sp_Trt1p	SOYLQKVGIPOGSILSSFLCHFYMEDLIDEYLSPT	6	LLRVVDDFLPITVNXKD	0	AKKPLNLSLRGFENHSTSLKTVI	17	KKAMPFFDFSV	181			
hTBT	KSYVOCQGIPOGSILSTLLCSLCYGMENKLFAGI	5	LLRLVDDFLVTPHLTH	0	AKTFLRTLVRGVPEYGCVVNLKTVV	19	HGLFFWCJLL	197			
Ea_p123	KFYKOTKGIPOGLCVSSILSSFYATLEESSLGFL	14	LHRLTDDYLLITTOENN	0	AVLPFIEKLINVSRENGPKFBNKKLOT	23	QDYCDWIGISI	179			
Sc_Est2p	KYIREDGLFGGSSLSAPIVDLVYDDLLEFYSEFK	8	ILKLADDPLIISTDQOO	0	VINIKKLANGGFKYNKAMRDKILA	20	KELEVWKSST	146			

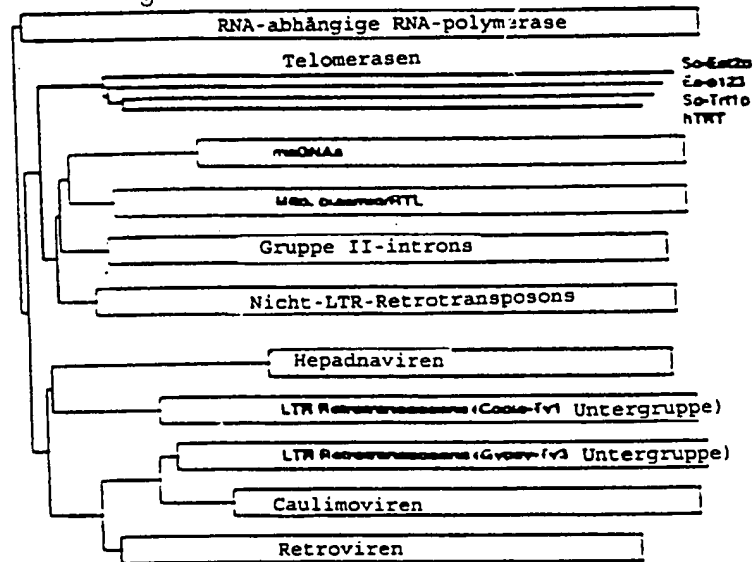
Motif B			Motif C			Motif D			Motif E		
TRT con	hPQG	pp hh h	h Y	DDhhh	Gh h	ck h	hG h				
Sp_Trt1p	TYHKPMLGLPGSLIPILCNIVMTLVDMWLEDYI	55	YVRYADDILIGVLGSKN	2	KNIKRDNNFLNS-LGLTHNEEKTLLI	4	ETPARFLGYNI				
hTBT	RAGQICAGVPQGSNLGPILYSIFSSDMPLPHIYHP	7	LSTYADDIVLSSDILA	6	NENYLKTFSDWADKGISVMAAKTCH	25	ESKQSYLGIVIL				
Ea_p123	GIRVQYHVLPGQWKGPSAIFQSSMTKILEPFFKCN	4	IYQYHDDLYVGSLEIG	1	HRTKIEELRQHLLRWGLTTPDKKHOK	0	EPPFLWMDITL				



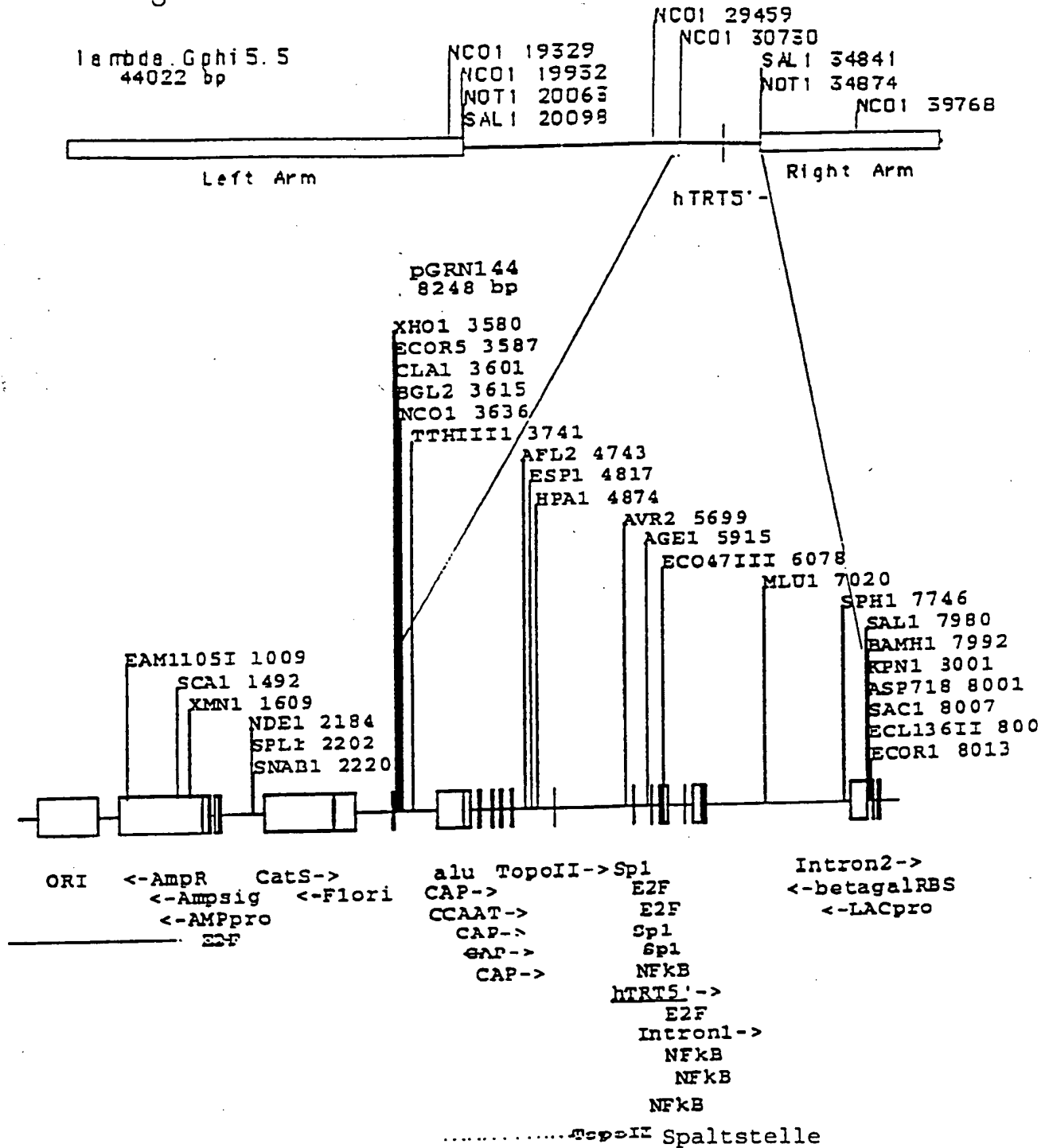
Figur 5



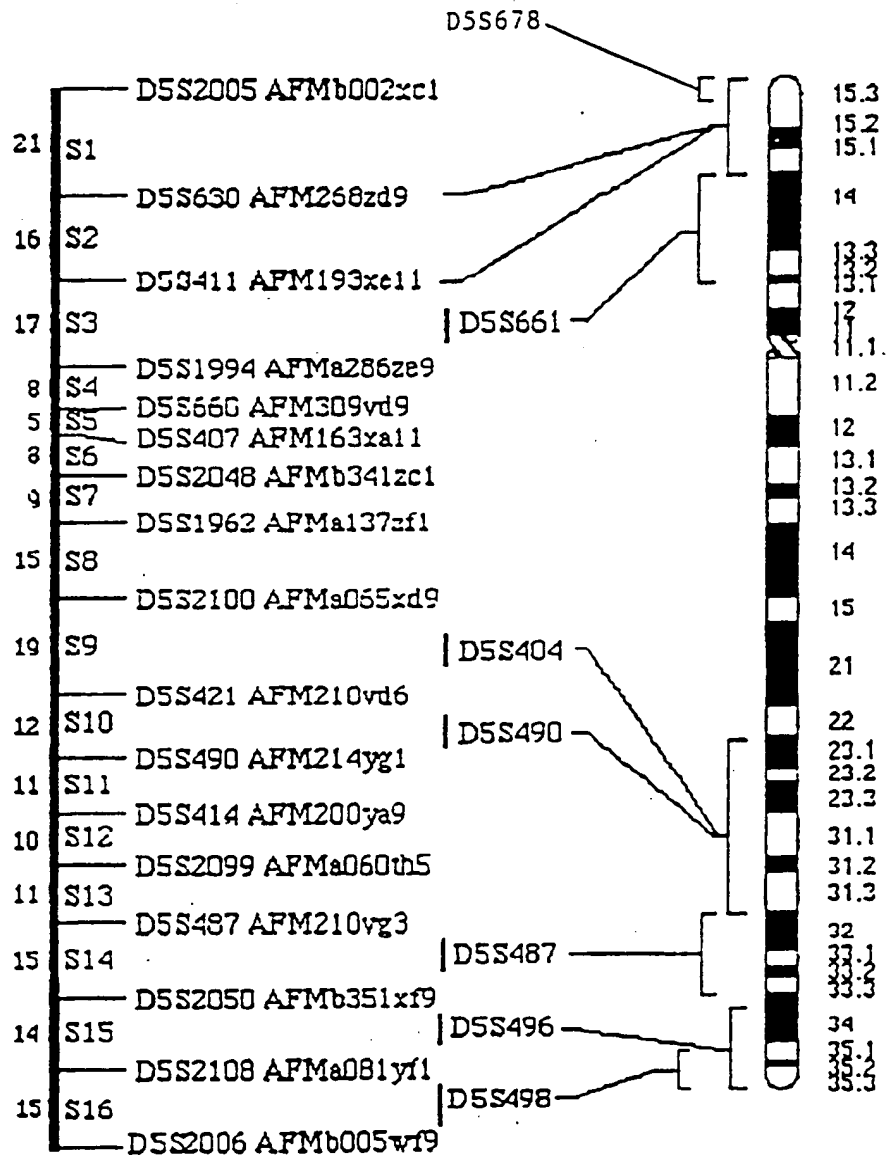
Figur 6



Figur 7

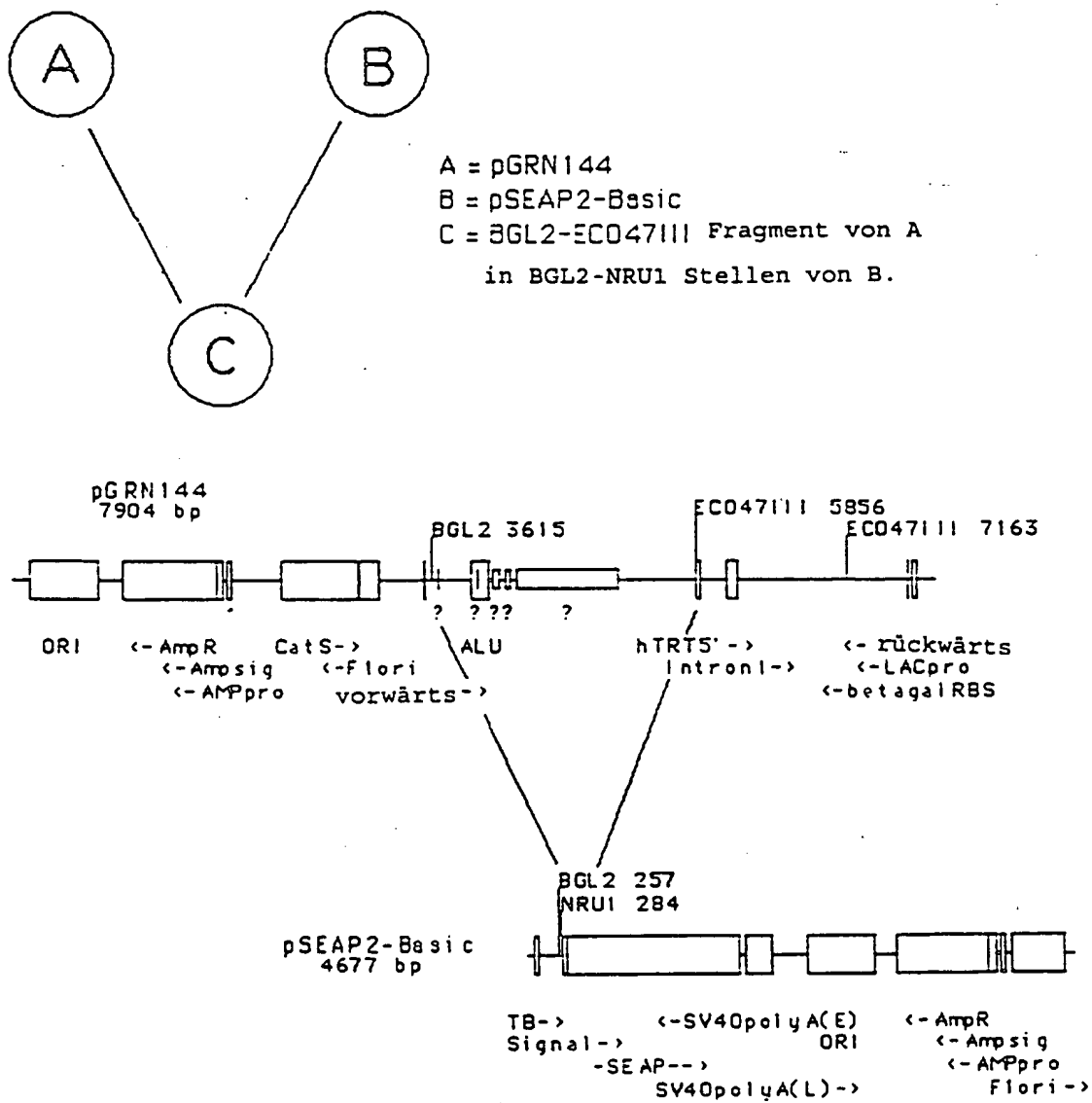


Figur 8



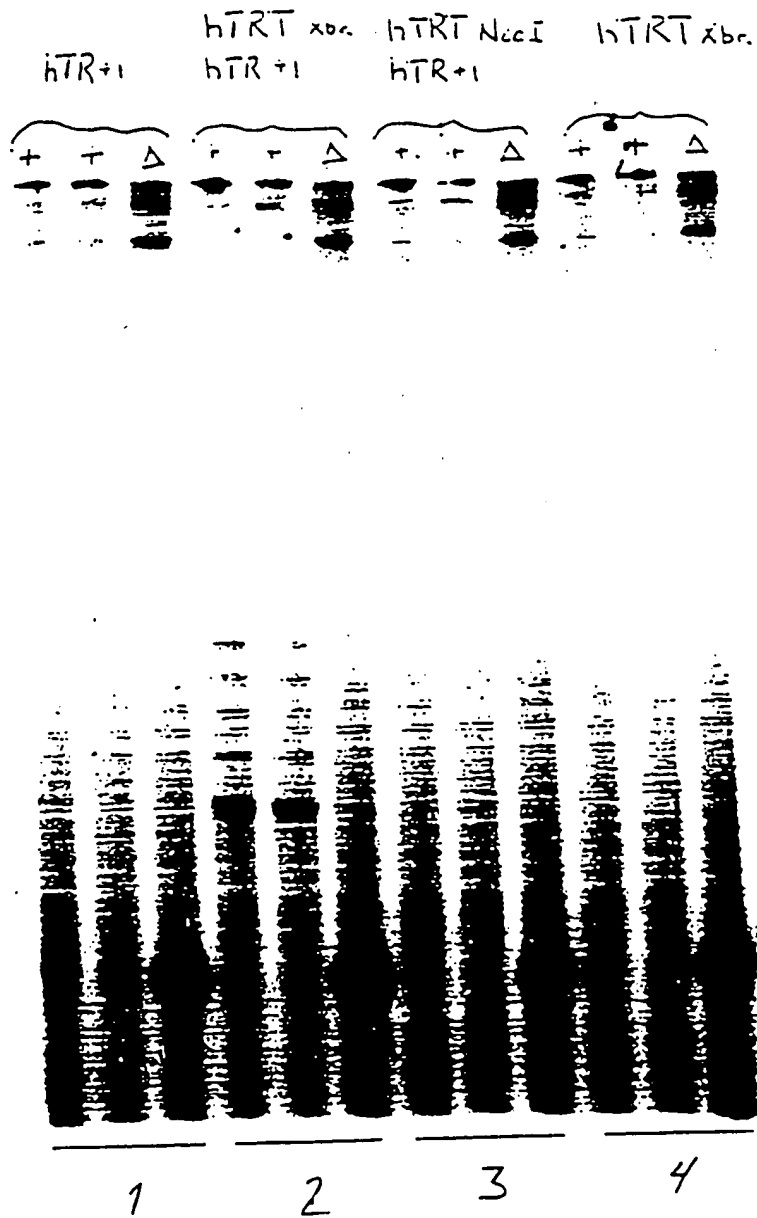
Figur 9

## Promoter/Reporter-Konstrukt

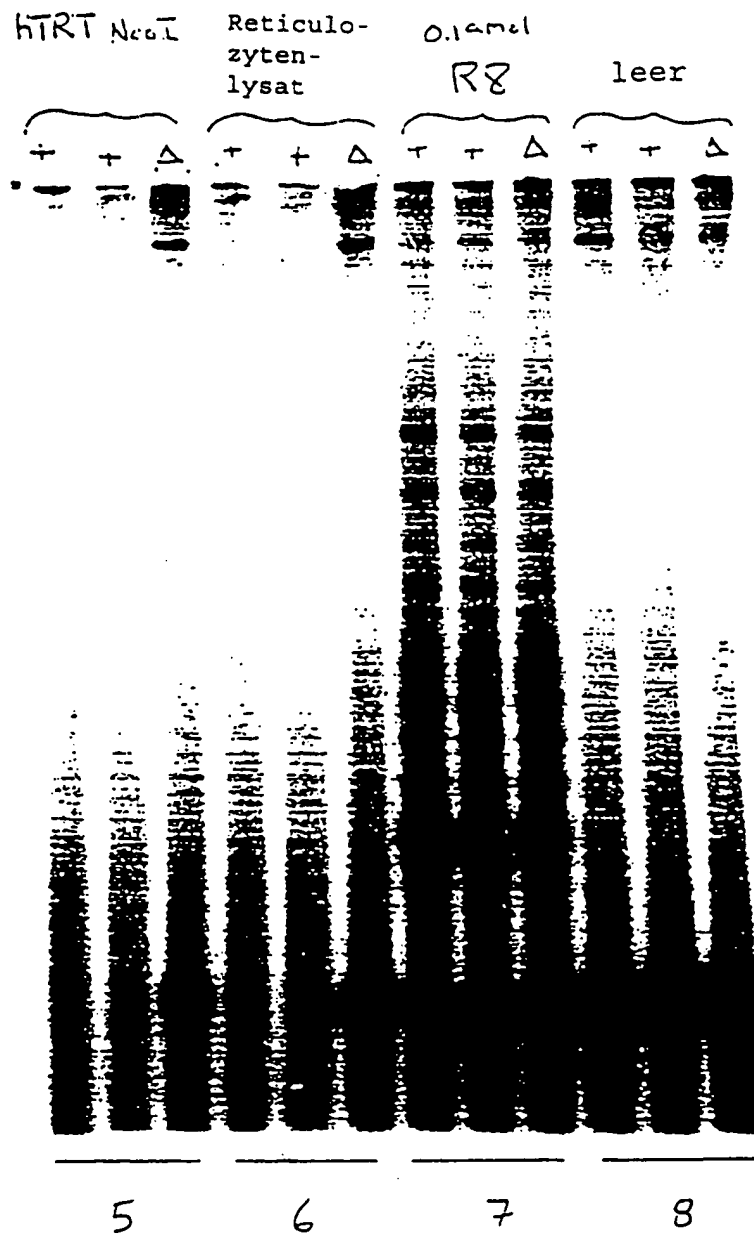


Figur 10

seite 1



Figur 10  
seite 2



### Telomerase-spezifische Motive

	MOTIV T	MOTIV T'
TRT con	W1	
hTRT	546 WLMSVYVELLRSEFFYVTEETTFQKNRLFFYRKSVWSKLQSIGI 13 EAEVR	E V
spTRT	429 WLYNSFIIPILQSFYITESDDLNRNRTVYFRKDIWKLCPFI 12 ENNVR	
Ea_p123	441 WIFEDLVSLRRCFFVTEQQKSYSKTYYYRKNIMDVIMKMSI 12 EKEVE	
Sc_Est2	366 WLFRLIPKIIQTFFYCTEISSVT. IYFRHDTWNKLITPFI 9 ENNVC	

### Telomerase RT Motive (Finger)

	MOTIV 1	MOTIV 2	MOTIV A	MOTIV B'
TRT con	R iPKk	FR I	p lyF D CYD i	Y q GiPQGS 1S 1 Y
hTRT	11 SRLRFIPKPDG 0 LRPIV	69 PELYFVKVDVTGAYDTI 104 YVQCQGIPOGSI STLCSLCY		
spTRT	10 AVIRLLPKKNT 0 FRLIT	66 RKKYFVRIDIKSCYDRI 99 YLQKVGIPOGSI LSSFLCHFYM		
Ea_p123	10 GKRLIPKKT 0 FRPIM	67 PKLFATMDIEKCYDSV 117 YKQTKGIPQGLCVSSILSSFY		
Sc_Est2	13 SKMRIIPKSN 2 FRIIA	68 PELYFMKFDVKSCYDSI 85 YIREDGLEQGSLSAPIVDLVY		
RT con	p hh h K	hr h	h hdh AF h	hPQg pp hh h



FIGUR 11  
Seite 2

## Telomerase RT Motive (Handfläche, "Primer-Grip")

	MOTIV C	MOTIV D	MOTIV E	
TRT con	111r1 DdEL it	g	w g s	1
hTRT	15 LLRLVDDFLVT	15 GVPEYGCVVNLKRTVV	24 WCGLLDTRTL	192
spTRT	16 VLLRVDDFLFIT	15 GFEKHNFSTSLKTVI	22 FFGFSVNMRSI	176
Ea_p123	24 LLMRLTDDYLLIT	15 VSRENGFKFNMKKIQ	28 WIGISIDMKTL	174
Sc_Est2	18 LILKLADDFLIIS	15 GFQKYNNAKANRDKILA	25 WKHSSTMNNFH	141
RT con	h y Dphhh	Gh h ck h	hLG h	
	F			

FIGUR 12

131 GGACCCGGCGGCTTTCCGCGCGCTGGTGGCCCAAGTGCCTGGTGTGCGTGCCCTGGGACGC  
 CCTGGGCGCGCGAAAGGCGCGCGACCAACGGGTACGGACCACACGCACGGGACCCCTGCG

NFkB\_CS1  
 GGGRTYYQC  
 NFkB-MHC-I.2  
 TGGGCTTCCCC  
 .....

241 ACGGCGCGCCCCCGCGCGCCCCCTCCTTCCGCGCAGGTGGGCGCTCCCCGGGGTCCGGCGTCCG  
 TGCCGGCGGGGGGGCGGGCGGGGGAGGAAGGCGGTCCACCCGGAGGGGGCCCCAGCCGCAGGC

Intron1  
 .....

301 GCTGGGGTTGAGGGCGGCGGGGGGAACCAGCGACATGCGGAGAGCAGCGCAGGCGACTC  
 CGACCCCAACTCCCGCGCGCCCCCTTGGTCGCTGTACGCCTCTCGTCGCGTCCGCTGAG

NFkB\_CS1  
 GGGRTYYQC  
 NFkB\_CS2  
 RGGGRMTYYCC  
 Topo\_II\_Spaltstelle  
 RNYNENNGYNGKTIYNY  
 .....

361 AGGGCGCTTCCCCCGCAGGTGTCCTGCCTGAAGGAGCTGGTGGCCCGAGTGCTGCAGAGG  
 TCCCGCGAAGGGGGCGTCCACAGGACGGACTTCCTCGACCACCGGGCTCAGGACGTCTCC

## Figur 13

Seite 1

```

1  AAAACCCCAA AACCCCAAAA CCCCTTTTAG AGCCCTGCAG TTGGAAATAT
51  AACCTCAGTA TTAATAAGCT CAGATTTTAA ATATTAATTA CAAAACCTAA
101 ATGGAGGTTG ATGTTGATAA TCAAGCTGAT AATCATGGCA TTCACTCAGC
151 TCTTAAGACT TGTGAAGAAA TTAAAGAAGC TAAAACGTTG TACTCTTGG
201 TCCAGAAAGT TATTAGATGA AGAAATCAAT CTCAAAGTCA TTATAAAGAT
251 TTAGAAGATA TAAAAATATT TGCCGAGACA AATATTGTTG CTACTCCACG
301 AGACTATAAT GAAGAAGATT TTAAAGTTAT TGCAAGAAAA GAAGTATTTT
351 CAACTGGACT AATGATCGAA CTTATTGACA AATGCTTAGT TGAACCTCTT
401 TCATCAAGCG ATGTTTCAGA TAGACAAAAA CTTCAATGAT TTGGATTTC
451 ACTTAAGGGA AATCAATTAG CAAAGACCCA TTTATTAACA GCTCTTTCAA
501 CTCAAAAGCA GTATTTCTTT CAAGACGAAT GGAACCAAGT TAGAGCAATG
551 ATTGGAAATG AGCTCTTCCG ACATCTCTAC ACTAAATATT TAATATTCCA
601 CGGAACCTCT GAAGGAACTC TTGTTCAATT TTGCGGGAAT AACGTTTTTG
651 ATCATTTGAA AGTCAACGAT AAGTTTGACA AAAAGCAAAA AGGTGGAGCA
701 GCAGACATGA ATGAACCTCG ATGTTGATCA ACCTGCAAAT ACAATGTCAA
751 GAATGAGAAA GATCACTTTC TCAACAACAT CAACGTGCCG AATTGGAATA
801 ATATGAAATC AAGAACCAGA ATATTTTATT GCACTCATTI TAATAGAAAT
851 AACCAATTCT TCAAAAAGCA TGAGTTTGTG AGTAACAAAA ACAATATTTT
901 AGCGATGGAC AGAGCTCAGA CGATATTCAC GAATATATTC AGATTTAATA
951 GAATTAGAAA GAAGCTAAAA GATAAGGTTA TCGAAAAAAT TGCCTACATG
1001 CTTGAGAAAG TCAAAGATTT TAACTTCAAC TACTATTTAA CAAAATCTTG
1051 TCCTCTTCCA GAAAATTGGC GGGAACGGAA ACAAAAAATC GAAACTTGA
1101 TAAATAAAAC TAGAGAAGAA AAGTCGAAGT ACTATGAAGA GCTGTTTAGC
1151 TACACAACCTG ATAATAAATG CGTCACACAA TTTATTAATG AATTTTCTA
1201 CAATATACTC CCCAAAGACT TTTTGACTGG AAGAAACCGT AAGAATTTTC
1251 AAAAGAAAGT TAAGAAATAT GTGGAACATA ACAAGCATGA ACTCATTAC
1301 AAAAATTAT TGCTTGAGAA GATCAATACA AGAGAAATAT CATGGATGCA
1351 GGTGAGACC TCTGCAAAGC ATTTTATTA TTTTGATCAC GAAAACATCT
1401 ACGTCTTATG GAAATTGCTC CGATGGATAT TCGAGGATCT CGTCGTCTCG
1451 CTGATTAGAT GATTTTCTA TGTACCCGAG CAACAGAAAA GTTACTCCAA
1501 AACCTATTAC TACAGAAAGA ATATTTGGGA CGTCATTATG AAAATGTCAA
1551 TCGCAGACTT AAAGAAGGAA ACGCTTGCTG AGGTCCAAGA AAAAGAGGTT
1601 GAAGAATGGA AAAAGTCGCT TGGATTTGCA CCTGGAAAAC TCAGACTAAT
1651 ACCGAAGAAA ACTACTTTC GTCCAATTAT GACTTTCAAT AAGAAGATTG
1701 TAAATTCAGA CCGGAAGACT ACAAATTAA CTACAAATAC GAAGTTATTG
1751 AACTCTCACT TAATGCTTAA GACATTGAAG AATAGAATGT TTAAAGATCC
1801 TTTTGGATTG GCTGTTTTTA ACTATGATGA TGTAAATGAAA AAGTATGAGG
1851 AGTTTGTGTTG CAAATGGAAG CAAGTTGGAC AACCAAAACT CTTCTTTGCA
1901 ACTATGGATA TCGAAAAGTG ATATGATAGT GTAAACAGAG AAAAATATC
1951 AACATTCTTA AAAACTACTA AATTACTTTC TTCAGATTTT TGGATTATGA
2001 CTGCACAAAT TCTAAAGAGA AAGAATAACA TAGTTATCGA TTCGAAAAAC
2051 TTTAGAAAGA AAGAAATGAA AGATTATTTT AGACAGAAAT TCCAGAAGAT
2101 TGCACTTGAA GGAGGACAAT ATCCAACCTT ATTCAGTGT CTTGAAAAATG
2151 AACAAAATGA CTTAAATGCA AAGAAAAAT TAATTGTTGA AGCAAAAGCA
2201 AGAAATTATT TTAAGAAAGA TAACTTACTT CAACCAAGTCA TTAATATTTG
2251 CCAATATAAT TACATTAAC TTAATGGGAA GTTTTATAAA CAAACAAAAC
2301 GAAATCCTCA AGGTCTTTGA GTTTCATCAA TTTTGTATC ATTTATTTAT

```

## Figur 13

Seite 2

2351 GCAACATTAG AGGAAAGCTC CTTAGGATTC CTTAGAGATG AATCAATGAA  
2401 CCCTGAAAAT CCAAATGTTA ATCTTCTAAT GAGACTTACA GATGACTATC  
2451 TTTTGATTAC AACTCAAGAG AATAATGCAG TATTGTTTAT TGAGAACTT  
2501 ATAAACGTAA GTCGTGAAAA TGGATTTAAA TTCAATATGA AGAACTACA  
2551 GACTAGTTTT CCATTAAGTC CAAGCAAATT TGCAAAATAC GGAATGGATA  
2601 GTGTTGAGGA GCAAAATATT GTTCAAGATT ACTGCGATTG GATTGGCATC  
2651 TCAATTGATA TGAAAACCTC TGCTTTAATG CCAAATATTA ACTTGAGAAT  
2701 AGAAGGAATT CTGTGTACAC TCAATCTAAA CATGCAAACA AAGAAAGCAT  
2751 CAATGTGGCT CAAGAAGAAA CTAAAGTCGT TTTTAATGAA TAACATTACC  
2801 CATTATTTTA GAAAGACGAT TACAACCGAA GACTTTCCGA ATAAAACCTC  
2851 CAACAAGTTA TTTATATCAG GCGGTTACAA ATACATGCAA TGAGCCAAAG  
2901 AATACAAGGA CCACTTTAAG AAGAACTTAG CTATGAGCAG TATGATCGAC  
2951 TTAGAGGTAT CTAAAATTAT ATACTCTGTA ACCAGAGCAT TCTTTAAATA  
3001 CCTTGTGTGC AATATTAAGG ATACAATTTT TGGAGAGGAG CATTATCCAG  
3051 ACTTTTTCCT TAGCACACTG AAGCACTTTA TTGAAATATT CAGCACAAAA  
3101 AAGTACATTT TCAACAGAGT TTGCATGATC CTCAAGGCCA AAGAAGCAAA  
3151 CCTAAAAAGT GACCAATGTC AATCTCTAAT TCAATATGAT GCATAGTCGA  
3201 CTATTCTAAC TTATTTTGGG AAGTTAATTT TCAATTTTGG TCTTATATAC  
3251 TGGGGTTTTG GGGTTTTGGG GTTTTGGGG

Figur 14

```

1 MEVDVDNQAD NHGHSALKT CEEIKEAKTL YSWIQKVIRC RNQSQSHYKD
51 LEDKIFAQT NIVATPRDYN EEDFKVIARK EVFSTGLMIE LIDKCLVELL
101 SSSDVSDRQK LQCFGFOLKG NQLAKTHLLT ALSTQKQYFF QDEWNQVRAM
151 IGNELFRHLY TKYLIFQRTS EGTLVQFCGN NVFDHLKVND KFDKKQKGG
201 ADMNEPRCCS TCKYNVKNEK DHFLNNINVP NWNNMKSRTF IFYCTFNRN
251 NQFFKKHEFV SNKNNISAMD RAQTIFTNIF RFNRIRKKLK DKVIEKIAYM
301 LEKVADFNFN YYLTKSCPLP ENWRERKQKI ENLINKTREE KSKYEEELFS
351 YTTDNKCVTQ FINEFFYNIL PKDFLTGRNR KNFQKKVKKY VELNKHELIH
401 KNLLLEKNT REISWMQVET SAKHEYYFDH ENIYVLWKLK RWTFEDLVVS
451 LIRCFYVTE QOKSYSKTY YRKNIWDVIM KMSIADLKKE TLAEVQEKV
501 EEWKKS LGFA PGKRLIPKK TTERPIMTFN KKIVNSDRKT TKLTNTKLL
551 NSHMLKTLK NRMFKDPFGF AVFNYDDVMK KYEEFVCKWK QVGQPKLFFA
601 TMDIEKCYDS VNREKLSTFL KTTKLLSSDF WIMTAQILKR KNNIVDSKN
651 FRKKEMKDYF RQKFQKIALE GGQYPTLFSV LENEQNDLNA KKT LIVEAKO
701 RNYFKKDNLL QPVINICQYN YINFNGKFYK QTKGIPOGLC VSSILSSFYY
751 ATLEESSLGF LRDESMNPEN PNVNLLMRLT DDYLLITTQE NNAVLFIEKL
801 INVSRENGFK FNMKKLOTSE PLSPSKFAKY GMDSVEEQNI VQDYCDWIGI
851 SIDMKTLALM PNINLRIEGI LCTLNLMQT KKASMWLKKK LKSFLMNTT
901 HYFRKTITTE DFANKTLNKL FISGGYKYMQ CAKEYKDHFK KNLAMSSMUD
951 LEVSKIIYSV TRAFFKYLVK NIKDTIFGEE HYPDFFLSTL KHEIEIFSTK
1001 KYENRVCMH LKAKEAKLKS DOCQSLIQYD A

```

[illegible]

1199	AAA	TCC	TCA	CAG	TCA	GAG	gtaacatataccatccctccgaccccccctccacccctgggatacagcttatacctatccgggacag	1272	86												
31	K	C	S	D	S	E															
1273	CTA	ATA	GCC	AAT	GTT	GTA	AAA	CAG	ATG	TTC	GAT	GAA	AGT	TTT	GAG	CCT	CGA	AGG	AAT	CTA	1332
37	L	I	A	N	V	V	K	Q	M	F	D	E	S	F	E	R	R	R	N	L	106
1333	CTG	ATG	AAA	GCG	TTT	TCC	ATG	gtaaggcattccctaccctgggaacacattccctggcaaccaccctgctcccaagaga	1405	113											
507	L	M	K	G	F	S	M														
1406	ccgcattcttaaccgataaaag	AAT	CAT	GAA	GAT	TTT	CGA	GCC	ATG	CAT	GTA	AAC	GGA	GTA	CAA	AAT					1469
114		N	H	E	D	F	R	A	M	H	V	N	G	V	Q	N					128
1470	GAT	CTC	GTT	TCT	ACT	TTT	CCT	AAT	TAC	CTT	ATA	TCT	ATA	CTT	GAG	TCA	AAA	AAT	TGG	CAA	1529
129	D	L	V	S	T	F	P	N	Y	L	I	S	I	L	E	S	K	N	W	Q	148
1530	CTT	TTG	TTA	GAA	AT	gtaaacaccctggctaaagatgctctggcacccttgaaacaagacctgacaagctacag	T	ATC	GCC												1601
149	L	L	L	E	I																155
1502	AGT	GAT	GCC	ATG	CAT	TAC	TTA	TTA	TCC	AAA	GGA	AGT	ATT	TTT	GAG	CCT	CTT	CCA	AAT	GAC	1661
155	S	D	A	M	H	Y	L	L	S	K	G	S	I	F	E	A	L	P	N	D	175
1652	AAT	TAC	CTT	CAG	ATT	TCT	GCG	ATA	CCA	CTT	TTT	AAA	AAT	AAT	GTG	TTT	GAG	GAA	ACT	GTG	1721
176	N	Y	L	Q	I	S	G	I	P	L	F	K	N	N	V	F	E	E	T	V	195
1722	TCA	AAA	AAA	AGA	AAG	CGA	ACC	ATT	GAA	ACA	TCC	ATT	ACT	CAA	AAT	AAA	AGC	GCC	CGC	AAA	1781
196	S	K	K	R	K	R	T	I	E	T	S	I	T	Q	N	K	S	A	R	K	215
1782	GAA	GTT	TCC	TGG	AAT	AGC	ATT	TCA	ATT	AGT	AGG	TTT	AGC	ATT	TTT	TAC	AGG	TCA	TCC	TAT	1841
216	E	V	S	W	N	S	I	S	I	S	R	F	S	I	F	Y	R	S	S	Y	235
1842	AAG	AAG	TTT	AAG	CAA	G	gtaacctaacaccctgctaccctccctcaacccaacccctag	AT	CTA	TAT	TTT	AAC									
1907																					
235	K	K	F	K	Q	D															245
1908	TTA	CAC	TCT	ATT	TCT	GAT	CGG	AAC	ACA	GTA	CAC	ATG	TGG	CTT	CAA	TGG	ATT	TTT	CCA	AGG	1967
246	L	H	S	I	C	D	R	N	T	V	H	M	W	L	Q	W	I	F	P	R	265
1968	CAA	TTT	GGA	CTT	ATA	AAC	GCA	TTT	CAA	GTG	AAG	CAA	TTG	CAC	AAA	GTG	ATT	CCA	CTG	GTA	2027
156	Q	F	G	L	I	N	A	F	Q	V	K	Q	L	H	K	V	I	P	L	V	285
2028	TCA	CAG	AGT	ACA	GTT	GTG	CCC	AAA													

2337	TTC TTT AAA TTA TCG AGA TAC GAG TCT TTT AGT TTA CAT TAT TTA ATG AGT AAG ATA AAG	2395
176	F L K L S R Y E S F S L H Y L M S N I K	395
2397	GCAACGCGCCAAACCCCCCACCACCCCAACCAACCAAG ATT TCA GAA ATT GAA TGG CTA GTG CTT GGA	2465
395	I S E I E W L V L G	405
2466	AAA AGG TCA AAT GCG AAA ATG TGC TTA AGT GAT TTT GAG AAA CGC AAG CAA ATA TTT GCG	2525
406	K R S N A X M C L S D F E K R K Q I F A	425
2525	GAA TTC ATC TAC TGG CTA TAC AAT TCG TTT ATA ATA CCT ATT TTA CAA TCT TTT TTT TAT	2585
426	E F I Y W L Y N S F I I P I L Q S F F Y	445
2585	ATC ACT GAA TCA AGT GAT TTA CGA AAT CGA ACT GTT TAT TTT AGA AAA GAT ATT TGG AAA	2645
446	I T E S S D L R N R T V Y F R K D I W K	465
2646	CTC TTT TGC CGA CCC TTT ATT ACA TCA ATG AAA ATG GAA GCG TTT GAA AAA-ATA AAC CAG	2705
466	L L C R P F I T S M K M E A F E K I N E	485
2706	GCAACCAAAAGCACCCCCCGCAAAAAGCCACACCCCCAG AAC AAT GTT AGG ATG GAT ACT CAG AAA ACT	2775
486	N N V R M D T Q K T	495
2775	ACT TTT CCT CCA GCA GTT ATT COT GTA TTA CCT AAG AAG AAT ACC TTT COT CTC ATT ACC	2835
496	T L P P A V I R L L P K K N T F R L I T	515
2835	AAT TTA AGA AAA AGA TTC TTA ATA AAG GCACCAACCCCCCGGCACCAACGCAACCCCCCCCCCAACCACTA	2906
516	N L R K R F L I K	524
2907	CAGCAG ATG COT TCA AAC AAA AAA ATG TTA GTC AGT ACC AAC CAA ACT TTA CGA CCT GTG	2967
525	H G S N K K M L V S T N Q T L R P V	542
2968	GCA TCG ATA CTC AAA CAT TTA ATC AAT GAA GAA AGT AGT GGT ATT CCA TTT AAC TTG GAG	3027
543	A S I L K H L I N E E S S G I P F N L E	562
3028	GTT TAC ATG AAG CTT CTT ACT TTT AAG AAG GAT CTT CTT AAG CAC CGA ATG TTT GG GCAAC	3088
563	V Y H K L L T F K K D L L K H R M F G	581
3089	CACACAATCGCGGATCCCCCAACCAACCCCCGAG G COT AAG AAG TAT TTT GTA CCG ATA GAT ATA	3155
582	R K K Y F V R I D I	591
3155	AAA TCC TGT GAT GAT CGA ATA AAG CAA GAT TTT ATG TTT CCG ATT GTT AAA AAG AAA CTC	3215
592	K S C Y D R I K Q D L M F R I V K K K L	611
3215	AAG GAT CCC GAA TTT GTA ATT CGA AAG TAT GCA ACC ATA CAT GCA ACA AGT GAC CGA GCT	3275
612	X D P E F V I R K Y A T I H A T S D R A	631
3276	ACA AAA AAC TTT GTT AGT GAG CCG TTT TCC TAT T GCAAGCCCCCCCCCAACCGAACCCCCCAACAA	3343
632	T K N F V S E A F S Y F	643
3344	ACCCCCCCCCAG TT GAT ATG GTG CCT TTT GAA AAA GTC GTG CAG TTA CTT TCT ATG AAA ACA	3405
644	D M V P F E K V V Q L L S M K T	659
3406	TCA GAT ACT TTT TTT GTT GAT TTT GTG GAT TAT TGG ACC AAA AGT TCT TCT GAA ATT TTT	3465
660	S D T L F V D F V D Y W T X S S S E I F	679
3466	AAA ATG CTC AAG GAA CAT CTC TCT CGA CAC ATT GTT AAG GCACCCCAACCGCGCAACCGCAACCA	3532
670	X M L K E H L E G H I V K	692



## Figur 15

Seite 4

1533 ctaacgaacacag ATA GGA AAT TCT GAA TAC CTT CAA AAA GTT GGT ATC GGT CAG GGC TCA 1593  
 593 I G N S Q Y L Q K V G I P Q G S 708

1594 ATT CTG TCA TCT TTT TTG TGT CAT TTC TAT ATG GAA GAT TTG ATT GAT GAA TAC CTA TCG 1653  
 709 I L S S F L C H F Y M E D L I D E Y L S 728

1654 TTT ACG AAA AAG AAA GGA TCA GTG TTG TTA CGA GTA GTC GAC GAT TTC CTC TTT ATA ACA 1713  
 729 F T K K K G S V L L R V V D D F L F I T 748

1714 GTT AAT AAA AAG GAT GCA AAA AAA TTT TTG AAT TTA TCT TTA AGA G gtagagctggcgccaccc 1777  
 749 V N K K D A K K F L N L S L R G 764

1778 caagctcccaaccgctgaag GA TTT GAG AAA CAC AAT TTT TCT ACG AGC CTG GAG AAA ACA GTA 1840  
 765 F E K H N F S T S L E K T V 778

1841 ATA AAC TTT GAA AAT AGT AAT GGG ATA ATA AAC AAT ACT TTT TTT AAT GAA AGC AAG AAA 1900  
 779 I N F E N S N G I I N N T F F N E S K K 798

1901 AGA ATG CCA TTC TTC GGT TTC TCT GTG AAC ATG AGG TCT CTT GAT ACA TTG TTA GCA TCT 1960  
 799 R M P F F G F S V N M R S L D T L L A C 818

1961 CTT AAA ATT GAT GAA GGC TTA TTT AAC TCT ACA TCT GTA GAG CTG ACG AAA CAT ATG GGG 4020  
 819 P K I D E A L F N S T S V E L T K H M G 838

4021 AAA TCT TTT TTT TAC AAA ATT CTA AG gtaacacggcgaaccgaatcaatagctgacaaataacccag A TCG 4089  
 839 K S F F Y K I L R S 848

4090 AGC CTT GCA TCC TTT GCA CAA GTA TTT ATT GAC ATT ACC CAC AAT TCA AAA TTC AAT TCT 4149  
 849 S L A S F A Q V F I D I T H N S K F N S 868

4150 TGC TGC AAT ATA TAT AGG CTA GGA TAC TCT ATG TOT ATG AGA GCA CAA GCA TAC TTA AAA 4209  
 869 C C N I Y R L G Y S M C M R A Q A Y L K 888

4210 AGG ATG AAG GAT ATA TTT ATT CCC CAA AGA ATG TTG ATA ACC G gtagagcacttaccctaacctaga 4274  
 889 R M K D I F L P Q R M F I T D 903

4275 aaagccatcccaaccacccag AT CTT TTG AAT GTT ATT GGA AGA AAA ATT TCG AAA AAG TTG GGC 4339  
 904 L L N V I G R K I W K K L A 917

4340 GAA ATA TTA GGA TAT ACC AGT AGG CGT TTC TTG TCC TCT GCA GAA GTC AAA TG gacggcgcc 4401  
 918 E I L G Y T S R R F L S S A E V K W 935

4402 ggcccccagaccccaagcaacattgacacacccag G CTT TTT TGT CTT CGA ATG AGA GAT GGT TTG AAA 4468  
 936 L F C L G M R D G L K 946

4469 CCC TCT TTC AAA TAT CAT CCA TGC TTC GAA CAG CTA ATA TAC CAA TTT CAG TCA TTG ACT 4528  
 947 P S F K Y H P C F E Q L I Y Q F Q E L T 966

4529 GAT CTT ATC AAG CCC CTA AGA CCA GTT TTG CGA CAG GTG TTA TTT TTA CAT AGA AGA ATA 4588  
 967 D L I K P L R P V L R Q V L F L H R R I 986

4589 GGT GAT TAA cgtccaccccaaccctcccaacacacaccccccacccggcgcccttaaaccaatccctaccctagccaca 4665  
 987 A D 989

Figur 15  
Seite 5

4666 gctgacccccaaagcaagcaccactcaggaactcttcagcaaaagtzaaaacttaccctcgtccaccagctcttgacttgacctgctcc 4745  
4746 ctttcccttatacctctttaaagaaaagacttgacagctggcttgcttgaccctcctcagcctccctttaaaccgggaagctggctttaaaca 4825  
4826 tttaaaagcaatcacatgaggttaactctctctctcacccttgaatacaaggaagagctggctctcttacaacgaataaacgctccgcctta 4905  
4906 atgctzaaaagacgaagacttatctctttaaaccaggggggacttaagcatatccctgaaggzaaaagagagcaatacaccctagctgct 4985  
4986 gctgaagaaagcaaggataaacttggaaccaagctctctgcaagacgacagggctaaactcttggtgacctgaactcttggtzaaaagc 5065  
5066 cccaggttatctcctcgttggtggctggctctctgctcctgagacgaaaaaagaaacttaagggtcagctcttgaaactaacagctccctta 5145  
5146 atgctcttatacaaggtctctgctctctctctgactcttctctctgctcctgctcctgggtgaaaaagaaatagctgcttgaagctctctgagctctt 5225  
5225 tctgaaatagcttzaaactctcttggtctctcttcaaagcgggaagctcttzaagaaactcttctgaagctctctgagctcttzaaaactctc 5305  
5306 tctctgactttaaaggaggaactctcttaccgactgaggaagacgggactagctcttaccagctctgctgaggaagaccttzaactctctgct 5385  
5386 aaaaaagaaaaatctcctcgggagacatctctctgactgaaactagactgctggagagctctctctcagctggactctctgactgcttaaca 5465  
5466 acctctctctctctgaaactgtaagctctctctctctctctctctgactctctctgactgctctctcagctgcttzaagctgacttzaaggtacc 5544

FIGUR 16  
Seite 1  
(Seq. ID. No. 1)

```

1 gcagcgctgc gtcctgctgc gcacgtggga agccctggcc ccggccaccc ccgctatgcc
61 gcgcgctccc cgctgcccag ccgtgcccct cctgctgccc agccactacc gcgagggtgct
121 gccgctggcc acgttccgtgc ggcgcctggg gcccagggc tggcggtgg tgacgcgsg
181 ggaccggcg gctttccgcg cgttgggtgg ccagtgcctg gtgtgctgc cgtgggacgc
241 acggccggcc ccgcccggcc cctccttccg ccagggtgtc tgccctgaagg agctgggtggc
301 ccgagtgtgt cagaggctgt gcgagcgcg gcggaagaac gtgctggcct tcggcttcgc
361 gctgctggac gggggcccg gggggccccc cgaggccttc accaccagcg tgcgcagcta
421 cctgcccac acggtgaccg acgcaactgc ggggagcggg gcgtgggggg tgcgtgctgc
481 ccgctggggc gacgacgtgc tggttcacct gctggcacgc tgcgcgtctc ttgtgctggc
541 ggctcccagc tgcgctacc aggtgtgccc gccgcccgtg taccagctcg gcgctgccac
601 tcaggcccgg ccccgccac acgctagtgg accccgaagg cgtctgggat gcgaacgggg
661 ctggaaccat agcgtcaggg aggcgggggt cccctggggc ctgccagccc cgggtgcgag
721 gaggcgcggg ggcagtggca gccgaagtct gccgttgccc aagaggccca ggcgtggcg
781 tgccccgag ccggagcgga cgcctgttgc gcagggggtc tgggcccacc cggcgaggac
841 gcgtggaccg agtgaccgtg gtttctgtgt ggtgtcacct gccagacctg ccgaagaagc
901 cacctcttgc gagggtgccc tctctggcac gcgcaactcc caccatccg tgggcccga
961 gcaccacggc gggcccccat ccacatcgcg gccaccacgt cctgggaca cgcttgtcc
1021 cccggtgtac gccgagacca agcacttccc ctactcctca ggcgacaagg agcagctgcg
1081 gccctcccct ctactcagct ccttgaggcc cagcctgact ggcgctcgga ggctcgtgga
1141 gacctcttgc ctgggttcca ggcctgggat gccagggact ccccgcgagt cccccgcct
1201 gccccagctc tactggcaaa tgcggccccc gtttctggag ctgcttggga accacgcga
1261 gtgccccctac ggggtgctcc tcaagacgca ctgcccgtcg cgagctgcgg tcaccccagc
1321 agccgggtgtc tgtgcccggg agaagcccca gggctctgtg gcggcccccg agggaggagg
1381 cacagacccc cgtcgccctg tgcagctgct ccgccagcac agcagccccc ggcaggtgta
1441 cggcttcgtg cgggcccggc tgcgcccggc ggtgccccca ggcctctggg gctccaggca
1501 caacgaacgc cgcttcccct gaacaccaa gaagttcac tccctgggga agcatgccaa
1561 gctctcgctg caggagctga cgtggaagat gagcgtgcgg gactgcgctt ggctgcgag
1621 gagcccaggg gttggctgtg ttccggccgc agagcaccgt ctgctgagg agatcctggc
1681 caagtccctg cactggctga tgagtgtgta cgtcgtcgag ctgctcagg ctttctttta
1741 tgtcacggag accacgttcc aaaagaacag gctcrttttc taccggaaga gtgtctggag
1801 caagtggcaa agcattggaa tcagacagca cttgaagagg gtgcagctgc gggagctgtc
1861 ggaagcagag gtcaggcagc atcgggaagc caggcccgcc ctgctgacgt ccagactccg
1921 cttcatcccc aagcctgacg ggcgtgcggc gattgtgaac atggactacg tcgtgggagc
1981 cagaacgttc cgcagagaaa agaggsgcga gcgtctcacc tcgaggggtga aggcactgtt
2041 cagcgtgttc aactacgagc gggcgcgsgc ccccgccctc ctgggcccct ctgtgctggg
2101 cctggacgat atccacaggg cctggcgcac cttcgtgctg cgtgtgcggg cccaggaccc
2161 gccgctgag ctgtactttg tcaaggtgga tgtgacgggc gcgtacgaca ccatccccc
2221 ggacaggctc acggagggtc tgcagcat catcaaacc cagaacacgt actgctgctg
2281 tcgggtatgcc gtggtccaga aggcggccca tgggcacgtc cgcaaggcct tcaagagcca
2341 cgtctctacc ttgacagacc tccagccgta catgcgacag ttcgtggctc acctgcagga
2401 gaccagcccg ctgagggatg ccgtcgtcat cgagcagagc tccctccctga atgaggccag
2461 cagtggcctc ttcgacgtct tccacgctt catgtgccac cagcccgctg gcacagggg
2521 caagtccctac gtccagtgc aggggatccc gcagggtctc atcctctcca cgctgctctg
2581 cagcctgtgc tacggcgaca tggagaacaa gctgtttgcy gggattcggc gggacgggct
2641 gctcctgctc ttggtggatg atttcttgtt ggtgacacct cacctcacc acgcgaaaac
2701 cttcctcagg acctgggtcc gaggtgtccc tgagtatggc tgcgtgggtga acttgcgga
2761 gacagtgggt aacttccccg tagaagacga ggcctgggt ggacaggctt ttgttcagat
2821 gccggcccac ggcctattcc cctgggtgcy cctgctgctg gatacccgga cctggagggt
2881 gcagagcgac tactccagct atgcccggac ctccatcaga gccagtctca cttcaaccg

```

FIGUR 16  
Seite 2  
(Seq. ID. No. 1)

```

2941 cggccttcaag gctgggagga acatgcgtcg caaactcttt ggggtcttgc ggctgaagtg
3001 tcacagcctg tttctggatt tgcaggtgaa cagcctccag acgggtgtgca ccaacatcta
3061 caagatcctc ctgctgcagg cgtacaggtt tcacgcatgt gtgctgcagc tcccatttca
3121 tcagcaagtt tggaagaacc ccacattttt cctgcgcgtc atctctgaca cggcctccct
3181 ctgctactcc atcctgaaaag ccaagaacgc agggatgtcg ctggggggcca agggcgccgc
3241 cggccctctg cctccgagg ccgtgcagtg gctgtgccac caagcattcc tgctcaagct
3301 gactcgacac cgtgtcacct acgtgccact cctgggggtca ctcaggacag cccagacgca
3361 gctgagtcgg aagctcccgg ggacgacgct gactgcccctg gaggccgcag ccaacccggc
3421 actgccccta gacttcaaya ccatcctgga ctgatggcca cccgcccaca gccaggccga
3481 gagcagacac cagcagccct gtcacgcggg gctctacgtc ccaggggagg aggggcggcc
3541 cacaccaggg cccgcaccgc tgggagtcct aggcctgagt gagtgtttgg ccgaggcctg
3601 catgtccggc tgaaggctga gtgtccggct gaggcctgag cgagtgtcca gccaaaggct
3661 gagtgtccag cacacctgcc gtcttcactt cccacaggc tggcgtctcg ctccaccca
3721 gggccagctt ttctcacca ggagccggc ttccactccc cacataggaa tagtccatcc
3781 ccagattcgc cattgttcac cctcgccct gccctccttt gccttccacc cccaccatcc
3841 aggtggagac cctgagaagg accctgggag ctctgggaat ttggagtga caaagggtgtg
3901 cctgtacac aggcgaggac cctgcacctg gatgggggtc cctgtgggtc aaattggggg
3961 gaggtgctgt gggagtaaaa tactgaatat atgagttttt cagttttgaa aaaaa

```

FIGUR 17  
MENSCHLICHE TRT PROTEIN-SEQUENZ  
(SEQ. NO. 2)

MPRAPRCRAVRSLLRSHYREVLPLATFVRRLLGPQGWRLVQRGDP  
AAFRALVAQCLVCVPWDARPPPAAPSFRQVSCLKELVARVLQRLCERGAKNVLAFGFA  
LLDGARGGPPPEAFTTSVRSYLPNTVTDALRGSGAWGLLLRRVGDDVLVHLLARCALFV  
LVAPSCAYQVCGPPLYQLGAATQARPPPHASGPRRRLGCERAWNHSVREAGVPLGLPA  
PGARRRGGSASRSLPLPKRPRRGAAPEPERTPVGQGSWAHPGRTRGPSDRGFCVVSPA  
RPAAEATSLEGALSGTRHSHPSVGRQHHAGPPSTSRPPRPWDTPCPPVYAETKHFLYS  
SGDKEQLRPSFLLSSLRPSLTGARRLVETIFLGSRPWMPGTPRRLPRLPQRYWQMRPL  
FLELLGNHAQCPYGVLLKTHCPLRAAVTPAAGVCAREKPGGSVAAPEEEDTDPRRLVQ  
LLRQHSSPWQVYGFVRACLRLRLVPPGLWGSRHNERFLRNTKKFISLGKHAKLSLQEL  
TWKMSVRDCAWLRRSPGVGCVPAAEHRLREEILAKFLHWLMSVYVVELLRSFFYVTET  
TFQKNRLFFYRKSVWSKLQSIGIRQHLKRVQLRELSEAEVRQHREARPALLTSRLRFI  
PKPDGLRPPIVNMDYVVGARTFRREKRAERLTSRVKALFSVLNYERARRPGLLGASVLG  
LDDIHRAWRTFVLRVRAQDPPPELYFVKVDVTGAYDTIPQDRLTEVIASIIKPQNTYC  
VRRYAVVQKAAHGHVRKAFKSHVSTLTDLQPYMRQFVAHLQETSPLRDAVVIEQSSSL  
NEASSGLFDVFLRFMCHHAVRIRGKSYVQCQGIQGSILSTLLCSLCYGD MENKLFAG  
IRRDGLLLRLVDDFLLVTPHLTHAKTFLRTLVRGVPEYGCVVNLRKTVNFPVEDEAL  
GGTAFVQMPAHGLFPWCGLLLDTRTLEVQSDYSSYARTSIRASLTFNRGFKAGRNMRR  
KLFGLVRLKCHSLFLDLQVNSLQTVCTNIYKILLQAYRFHACVLQLPFHQVWKNPT  
FFLRVISDTASLCYSILKAKNAGMSLGAKGAAGPLPSEAVQWLCHQAFLKLTRHRVT  
YVPLLGSRLRTAQTQLSRKLPGTTLTALEAAANPALPSDFKTILD

FIGUR 18  
Clon 712562  
(SEQ ID NO. 3)

GGCCAAGTTCCTGCACTGGCTGATGAGTGTGTACGTCGTCGAGCTGCTCAGGTCTTTCTT  
TTATGTCACGGAGACCACGTTTCAAAGAACAGGCTCTTTTTCTACCGGAAGAGTGTCTG  
GAGCAAGTTGCAAAGCATTGGAATCAGACAGCACTTGAAGAGGGTGCAGCTGCGGGAGCT  
GTCGGAAGCAGAGGTCAGGCAGCATCGGGAAGCCAGGCCCGCCCTGCTGACGTCCAGACT  
CCGCTTCATCCCCAAGCCTGACGGGCTGCGGCCGATTGTGAACATGGACTACGTCTGCGG  
AGCCAGAACGTTCCGCAGAGAAAAGAGGGCCGAGCGTCTCACCTCGAGGGTGAAGGCACT  
GTTACAGCGTGCTCAACTACGAGCGGGCGCGGCCGCCCTCTGCGGCGCCTCTGTGCT  
GGGCTTGGACGATATCCACAGGGCCTGGCGCACCTTCGTGCTGCGTGTGCGGGCCAGGA  
CCCGCCGCCTGAGCTGTACTTTGTCAAGGTGGATGTGACGGGCGCGTACGACACCATCCC  
CCAGGACAGGCTCACGGAGGTCATCGCCAGCATCATCAAACCCAGAACACGTACTGCGT  
GCGTCGGTATGCCGTGGTCCAGAAGGCCGCCCATGGGCACGTCCGCAAGGCCTTCAAGAG  
CCACGTCTACGTCCAGTGCCAGGGGATCCCGCAGGGCTCCATCCTCTCCACGCTGCTCT  
GCAGCCTGTGCTACGGCGACATGGAGAACAAGCTGTTTGCGGGGATTTCGGCGGGACGGGC  
TGCTCCTGCGTTTGGTGGATGATTTCTTGTTGGTGACACCTCACCTCACCCACGCGAAAA  
CCTTCCTCAGGACCCTGGTCCGAGGTGTCCCTGAGTATGGCTGCGTGGTGAACCTGCGGA  
AGACAGTGGTGAACCTCCCTGTAGAAGACGAGGCCCTGGGTGGCACGGCTTTTGTTCAGA  
TGCCGGGCCACGGCCTATTCCTTGGTGCGGCCTGCTGCTGGATAACCGGACCCTGGAGG  
TGCAGAGCGACTACTCCAGCTATGCCCCGACCTCCATCAGAGCCAGTCTCACCTTCAACC  
GCGGCTTCAAGGCTGGGAGGAACATGCGTCGCAAACCTTTTGGGGTCTTGCGGCTGAAGT  
GTCACAGCCTGTTTCTGGATTTGCAGGTGAACAGCCTCCAGACGGTGTGCACCAACATCT  
ACAAGATCCTCCTGCTGCAGGCGTACAGGTTTACGCGATGTGTGCTGCAGCTCCCATTT  
ATCAGCAAGTTTGGAGAACCCACATTTTCTGCGCGTCATCTCTGACACGGCCTCCC  
TCTGCTACTCCATCCTGAAAGCCAAGAACGCAGGGATGTGCTGGGGGCCAAGGGCGCCG  
CCGGCC7TCTGCCCTCCGAGGCCGTGCAGTGGCTGTGCCACCAAGCATTCCTGCTCAAGC  
TGACTCGACACCGTGTACCTACGTGCCACTCCTGGGGTCACTCAGGACAGCCCAGACGC  
AGCTGAGTCGGAAGCTCCCGGGGACGACGCTGACTGCCCTGGAGGCCGACGCCAACC  
CACTGCCCTCAGACTTCAAGACCATCCTGGACTGATGGCCACCCGCCACAGCCAGGCCG  
AGAGCAGACACCAGCAGCCCTGTACGCCGGGCTCTACGTCCAGGGAGGGAGGGGCGGC  
CCACACCCAGGCCTGCACCGCTGGGAGTCTGAGGCCTGAGTGAGTGTGTTGGCCGAGGCCT  
GCATGTCCGGCTGAAGGCTGAGTGTCCGGCTGAGGCCTGAGCGAGTGTCCAGCCAAGGGC  
TGAGTGTCCAGCACACCTGCCGTCTTCACTTCCCCACAGGCTGGCGCTCGGCTCCACCCC  
AGGGCCAGCTTTTCTCACCAGGAGCCCGGCTTCCACTCCCCACATAGGAATAGTCCATC  
CCCAGATTGCCATTGTTTACCCCTCGCCCTGCCCTCCTTTGCCCTTCCACCCCCACCATC  
CAGGTGGAGACCCTGAGAAGGACCCTGGGAGCTCTGGGAATTTGGAGTGACCAAAGGTGT  
GCCCTGTACACAGGCGAGGACCCTGCACCTGGATGGGGGTCCCTGTGGGTCAAATTGGGG  
GGAGGTGCTGTGGGAGTAAATACTGAATATATGAGTTTTTCAGTTTTTG0AAAAAAAAA  
AAAAAAAAAAAAAAAAA

## FIGUR 19

SEQ ID NO. 10 :

MetSerValTyrValValGluLeuLeuArgSerPhePhe  
TyrValThrGluThrThrPheGlnLysAsnArgLeuPhePheTyrArgLysSerValTrp  
SerLysLeuGlnSerIleGlyIleArgGlnHisLeuLysArgValGlnLeuArgGluLeu  
SerGluAlaGluValArgGlnHisArgGluAlaArgProAlaLeuLeuThrSerArgLeu  
ArgPheIleProLysProAspGlyLeuArgProIleValAsnMetAspTyrValValGly  
AlaArgThrPheArgArgGluLysArgAlaGluArgLeuThrSerArgValLysAlaLeu  
PheSerValLeuAsnTyrGluArgAlaArgArgProGlyLeuLeuGlyAlaSerValLeu  
GlyLeuAspAspIleHisArgAlaTrpArgThrPheValLeuArgValArgAlaGlnAsp  
ProProProGluLeuTyrPheValLysValAspValThrGlyAlaTyrAspThrIlePro  
GlnAspArgLeuThrGluValIleAlaSerIleIleLysProGlnAsnThrTyrCysVal  
ArgArgTyrAlaValValGlnLysAlaAlaHisGlyHisValArgLysAlaPheLysSer  
HisValLeuArgProValProGlyAspProAlaGlyLeuHisProLeuHisAlaAlaLeu  
GlnProValLeuArgArgHisGlyGluGlnAlaValCysGlyAspSerAlaGlyArgAla  
AlaProAlaPheGlyGly

1  
met  
GCAGCGCTGCGTCCTGCTGCGCACGTGGGAAGCCCTGGCCCCGGCCACCCCCGCG ATG

10  
pro arg ala pro arg cys arg ala val arg ser leu leu arg ser  
CCG CGC GCT CCC CGC TGC CGA GCC GTG CGC TCC CTG CTG CGC AGC

20 30  
his tyr arg glu val leu pro leu ala thr phe val arg arg leu  
CAC TAC CGC GAG GTG CTG CCG CTG GCC ACG TTC GTG CGG CGC CTG

40  
gly pro gln gly trp arg leu val gln arg gly asp pro ala ala  
GGG CCC CAG GGC TGG CGG CTG GTG CAG CGC GGG GAC CCG GCG GCT

50 60  
phe arg ala leu val ala gln cys leu val cys val pro trp asp  
TTC CGC GCG CTG GTG GCC CAG TGC CTG GTG TGC GTG CCC TGG GAC

70  
ala arg pro pro pro ala ala pro ser phe arg gln val ser cys  
GCA CGG CCG CCC CCC GCC GCC CCC TCC TTC CGC CAG GTG TCC TGC

80 90  
leu lys glu leu val ala arg val leu gln arg leu cys glu arg  
CTG AAG GAG CTG GTG GCC CGA GTG CTG CAG AGG CTG TGC GAG CGC

100  
gly ala lys asn val leu ala phe gly phe ala leu leu asp gly  
GGC GCG AAG AAC GTG CTG GCC TTC GGC TTC GCG CTG CTG GAC GGG

110 120  
ala arg gly gly pro pro glu ala phe thr thr ser val arg ser  
GCC CGC GGG GGC CCC CCC GAG GCC TTC ACC ACC AGC GTG CGC AGC



## FIGUR 20

Seite 2

130

tyr leu pro asn thr val thr asp ala leu arg gly ser gly ala  
TAC CTG CCC AAC ACG GTG ACC GAC GCA CTG CGG GGG AGC GGG GCG

140

trp gly leu leu leu arg arg val gly asp asp val leu val his  
TGG GGG CTG CTG CTG CGC CGC GTG GGC GAC GAC GTG CTG GTT CAC

150

160

leu leu ala arg cys ala leu phe val leu val ala pro ser cys  
CTG CTG GCA CGC TGC GCG CTC TTT GTG CTG GTG GCT CCC AGC TGC

170

ala tyr gln val cys gly pro pro leu tyr gln leu gly ala ala  
GCC TAC CAG GTG TGC GGG CCG CCG CTG TAC CAG CTC GGC GCT GCC

180

190

thr gln ala arg pro pro pro his ala ser gly pro arg arg arg  
ACT CAG GCC CGG CCC CCG CCA CAC GCT AGT GGA CCC CGA AGG CGT

200

leu gly cys glu arg ala trp asn his ser val arg glu ala gly  
CTG GGA TGC GAA CGG GCC TGG AAC CAT AGC GTC AGG GAG GCC GGG

210

220

val pro leu gly leu pro ala pro gly ala arg arg arg gly gly  
GTC CCC CTG GGC CTG CCA GCC CCG GGT GCG AGG AGG CGC GGG GGC

230

ser ala ser arg ser leu pro leu pro lys arg pro arg arg gly  
AGT GCC AGC CGA AGT CTG CCG TTG CCC AAG AGG CCC AGG CGT GGC

240

250

ala ala pro glu pro glu arg thr pro val gly gln gly ser trp  
GCT GCC CCT GAG CCG GAG CGG ACG CCC GTT GGG CAG GGG TCC TGG

260

ala his pro gly arg thr arg gly pro ser asp arg gly phe cys  
GCC CAC CCG GGC AGG ACG CGT GGA CCG AGT GAC CGT GGT TTC TGT

270

## FIGUR 20

Seite 3

280  
 val val ser pro ala arg pro ala glu glu ala thr ser leu glu  
 GTG GTG TCA CCT GCC AGA CCC GCC GAA GAA GCC ACC TCT TTG GAG

290 300  
 gly ala leu ser gly thr arg his ser his pro ser val gly arg  
 GGT GCG CTC TCT GGC ACG CGC CAC TCC CAC CCA TCC GTG GGC CGC

310  
 gln his his ala gly pro pro ser thr ser arg pro pro arg pro  
 CAG CAC CAC GCG GGC CCC CCA TCC ACA TCG CGG CCA CCA CGT CCC

320 330  
 trp asp thr pro cys pro pro val tyr ala glu thr lys his phe  
 TGG GAC ACG CCT TGT CCC CCG GTG TAC GCC GAG ACC AAG CAC TTC

340  
 leu tyr ser ser gly asp lys glu gln leu arg pro ser phe leu  
 CTC TAC TCC TCA GGC GAC AAG GAG CAG CTG CGG CCC TCC TTC CTA

350 360  
 leu ser ser leu arg pro ser leu thr gly ala arg arg leu val  
 CTC AGC TCT CTG AGG CCC AGC CTG ACT GGC GCT CGG AGG CTC GTG

370  
 glu thr ile phe leu gly ser arg pro trp met pro gly thr pro  
 GAG ACC ATC TTT CTG GGT TCC AGG CCC TGG ATG CCA GGG ACT CCC

380 390  
 arg arg leu pro arg leu pro gln arg tyr trp gln met arg pro  
 CGC AGG TTG CCC CGC CTG CCC CAG CGC TAC TGG CAA ATG CGG CCC

400  
 leu phe leu glu leu leu gly asn his ala gln cys pro tyr gly  
 CTG TTT CTG GAG CTG CTT GGG AAC CAC GCG CAG TGC CCC TAC GGG

410 420  
 val leu leu lys thr his cys pro leu arg ala ala val thr pro  
 GTG CTC CTC AAG ACG CAC TGC CCG CTG CGA GCT GCG GTC ACC CCA

## FIGUR 20

Seite 4

ala ala gly val cys ala arg glu lys pro gln gly ser val ala  
GCA GCC GGT GTC TGT GCC CGG GAG AAG CCC CAG GGC TCT GTG GCG

440 450  
ala pro glu glu glu asp thr asp pro arg arg leu val gln leu  
GCC CCC GAG GAG GAG GAC ACA GAC CCC CGT CGC CTG GTG CAG CTG

460  
leu arg gln his ser ser pro trp gln val tyr gly phe val arg  
CTC CGC CAG CAC AGC AGC CCC TGG CAG GTG TAC GGC TTC GTG CGG

470 480  
ala cys leu arg arg leu val pro pro gly leu trp gly ser arg  
GCC TGC CTG CGC CGG CTG GTG CCC CCA GGC CTC TGG GGC TCC AGG

490  
his asn glu arg arg phe leu arg asn thr lys lys phe ile ser  
CAC AAC GAA CGC CGC TTC CTC AGG AAC ACC AAG AAG TTC ATC TCC

500 510  
leu gly lys his ala lys leu ser leu gln glu leu thr trp lys  
CTG GGG AAG CAT GCC AAG CTC TCG CTG CAG GAG CTG ACG TGG AAG

520  
met ser val arg asp cys ala trp leu arg arg ser pro gly val  
ATG AGC GTG CGG GAC TGC GCT TGG CTG CGC AGG AGC CCA GGG GTT

530 540  
gly cys val pro ala ala glu his arg leu arg glu glu ile leu  
GGC TGT GTT CCG GCC GCA GAG CAC CGT CTG CGT GAG GAG ATC CTG

550  
ala lys phe leu his trp leu met ser val tyr val val glu leu  
GCC AAG TTC CTG CAC TGG CTG ATG AGT GTG TAC GTC GTC GAG CTG

560 570  
leu arg ser phe phe tyr val thr glu thr thr phe gln lys asn  
CTC AGG TCT TTC TTT TAT GTC ACG GAG ACC ACG TTT CAA AAG AAC

580  
arg leu phe phe tyr arg lys ser val trp ser lys leu gln ser  
AGG CTC TTT TTC TAC CGG AAG AGT GTC TGG AGC AAG TTG CAA AGC

## FIGUR 20

Seite 5

590 600  
ile gly ile arg gln his leu lys arg val gln leu arg glu leu  
ATT GGA ATC AGA CAG CAC TTG AAG AGG GTG CAG CTG CGG GAG CTG

610  
ser glu ala glu val arg gln his arg glu ala arg pro ala leu  
TCG GAA GCA GAG GTC AGG CAG CAT CGG GAA GCC AGG CCC GCC CTG

620 630  
leu thr ser arg leu arg phe ile pro lys pro asp gly leu arg  
CTG ACG TCC AGA CTC CGC TTC ATC CCC AAG CCT GAC GGG CTG CGG

640  
pro ile val asn met asp tyr val val gly ala arg thr phe arg  
CCG ATT GTG AAC ATG GAC TAC GTC GTG GGA GCC AGA ACG TTC CGC

650 660  
arg glu lys arg ala glu arg leu thr ser arg val lys ala leu  
AGA GAA AAG AGG GCC GAG CGT CTC ACC TCG AGG GTG AAG GCA CTG

670  
phe ser val leu asn tyr glu arg ala arg arg pro gly leu leu  
TTC AGC GTG CTC AAC TAC GAG CGG GCG CGG CGC CCC GGC CTC CTG

680 690  
gly ala ser val leu gly leu asp asp ile his arg ala trp arg  
GGC GCC TCT GTG CTG GGC CTG GAC GAT ATC CAC AGG GCC TGG CGC

700  
thr phe val leu arg val arg ala gln asp pro pro pro glu leu  
ACC TTC GTG CTG CGT GTG CGG GCC CAG GAC CCG CCG CCT GAG CTG

710 720  
tyr phe val lys val asp val thr gly ala tyr asp thr ile pro  
TAC TTT GTC AAG GTG GAT GTG ACG GGC GCG TAC GAC ACC ATC CCC

730  
gln asp arg leu thr glu val ile ala ser ile ile lys pro gln  
CAG GAC AGG CTC ACG GAG GTC ATC GCC AGC ATC ATC AAA CCC CAG

## FIGUR 20

Seite 6

740 750  
 asn thr tyr cys val arg arg tyr ala val val gln lys ala ala  
 AAC ACG TAC TGC GTG CGT CGG TAT GCC GTG GTC CAG AAG GCC GCC

760  
 his gly his val arg lys ala phe lys ser his val leu arg pro  
 CAT GGG CAC GTC CGC AAG GCC TTC AAG AGC CAC GTC CTA CGT CCA

770 780  
 val pro gly asp pro ala gly leu his pro leu his ala ala leu  
 GTG CCA GGG GAT CCC GCA GGG CTC CAT CCT CTC CAC GCT GCT CTG

790  
 gln pro val leu arg arg his gly glu gln ala val cys gly asp  
 CAG CCT GTG CTA CGG CGA CAT GGA GAA CAA GCT GTT TGC GGG GAT

800 807  
 ser ala gly arg ala ala pro ala phe gly gly OP  
 TCG GCG GGA CGG GCT GCT CCT GCG TTT GGT GGA TGA TTTCTTGTTGGT

GACACCTCACCTCACCCACGCGAAAACCTTCCTCAGGACCCTGGTCCGAGGTGTCCCTGA  
 GTATGGCTGCGTGGTGAACCTTGCGGAAGACAGTGGTGAACCTTCCCTGTAGAAGACGAGGC  
 CCTGGGTGGCACGGCTTTTGTTCAGATGCCGGCCACGGCCTATCCCCCTGGTGCGGCCT  
 GCTGCTGGATAACCCGGACCCTGGAGGTGCAGAGCGACTACTCCAGCTATGCCCGGACCTC  
 CATCAGAGCCAGTCTCACCTTCAACCGCGGCTTCAAGGCTGGGAGGAACATGCGTCGCAA  
 ACTCTTTGGGGTCTTGCGGCTGAAGTGTCAACAGCCTGTTTCTGGATTTGCAGGTGAACAG  
 CCTCCAGACGGTGTGCACCAACATCTACAAGATCCTCCTGCTGCAGGCGTACAGGTTTCA  
 CGCATGTGTGCTGCAGCTCCCATTTTCATCAGCAAGTTTGAAGAACCCACATTTTTCCT  
 GCGCGTCATCTCTGACACGGCCTCCCTCTGCTACTCCATCCTGAAAGCCAAGAACGCAGG  
 GATGTCGCTGGGGGCCAAGGGCGCGCGGCCCTCTGCCCTCCGAGGCCGTGCAGTGGCT  
 GTGCCACCAAGCATTCTGCTCAAGCTGACTCGACACCGTGTACCTACGTGCCACTCCT

## FIGUR 20

Seite 7

GGGGTCACTCAGGACAGCCCAGACGCAGCTGAGTCGGAAGCTCCCGGGGACGACGCTGAC  
TGCCCTGGAGGCCGCGAGCCAACCCGGCACTGCCCTCAGACTTCAAGACCATCCTGGACTG  
ATGGCCACCCGCCCACAGCCAGGCCGAGAGCAGACACCAGCAGCCCTGTCACGCCGGGCT  
CTACGTCCCAGGGAGGGAGGGGCGGCCACACCCAGGCCCGCACCGCTGGGAGTCTGAGG  
CCTGAGTGAGTGTTTGGCCGAGGCCTGCATGTCCGGCTGAAGGCTGAGTGTCGGCTGAG  
GCCTGAGCGAGTGTCAGCCAAGGGCTGAGTGTCAGCACACCTGCCGTCTTCACTTCCC  
CACAGGCTGGCGCTCGGCTCCACCCAGGGCCAGCTTTTCCTCACCAGGAGCCCGGCTTC  
CACTCCCCACATAGGAATAGTCCATCCCCAGATTGCGCCATTGTTCACCCCTCGCCCTGCC  
CTCCTTTGCCTTCCACCCCCACCATCCAGGTGGAGACCCTGAGAAGGACCCTGGGAGCTC  
TGGAATTTGGAGTGACCAAAGGTGTGCCCTGTACACAGGCGAGGACCCTGCACCTGGAT  
GGGGGTCCCTGTGGGTCAAATTGGGGGGAGGTGCTGTGGGAGTAAAATACTGAATATATG  
AGTTTTTTCAGTTTTTGAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

FIGUR 21  
Genomische DNA-Insertion von pGRN144

```

1  CCATGGGACCCACTGCAGGGGCAGCTGGGAGGCTGCAGGCTTCAGGTCCCAGTGGGGTTG
   GGTACCCTGGGTGACGTCCCCGTCGACCCTCCGACGTCCGAAGTCCAGGGTCACCCCAAC

61  CCATCTGCCAGTAGAAACCTGATGTAGAATCAGGGCGCGAGTGTGGACACTGTCCTGAAT
   GGTAGACGGTCATCTTTGGACTACATCTTAGTCCCGCGCTCACACCTGTGACAGGACTTA

121 CTCAATGTCTCAGTGTGTGCTGAAACATGTAGAAATTAAAGTCCATCCCTCCTACTCTAC
   GAGTTACAGAGTCACACACGACTTTGTACATCTTTAATTTAGGTAGGGAGGATGAGATG

181 TGGGATTGAGCCCCCTCCCTATCCCCCCCCAGGGGCAGAGGAGTTCCTCTCACTCCTGTG
   ACCCTAACTCGGGGAAGGGATAGGGGGGGGTCCCCGTCTCCTCAAGGAGAGTGAGGACAC

241 GAGGAAGGAATGATACTTTGTTATTTTCACTGCTGGTACTGAATCCACTGTTTCATTTG
   CTCCTTCCTTACTATGAAACAATAAAAAGTGACGACCATGACTTAGGTGACAAAGTAAAC

                               *****
301 TTGGTTTGTTTGTTTGTTTGTTTGAGAGGCGGTTTCACTCTTGTTGCTCAGGCTGGAGGGAG
   AACCAACAAACAAAACAAACTCTCCGCCAAAGTGAGAACAACGAGTCCGACCTCCCTC

                               *****
361 TGCAATGGCGCGATCTTGGCTTACTGCAGCCTCTGCCTCCCAGGTTCAAGTGATTCTCCT
   ACGTTACCGCGCTAGAACCGAATGACGTCGGAGACGGAGGGTCCAAGTTCACTAAGAGGA

                               alu
                               *****
421 GCTTCCGCCTCCCATTGTTGGCTGGGATTACAGGCACCCGCCACCATGCCAGCTAATTTTT
   CGAAGGCGGAGGGTAAACCGACCCTAATGTCCGTGGGCGGTGGTACGGGTCGATTAAAAA

                               ==

                               *****
481 TGTATTTTTAGTAGAGACGGGGGTGGGGGTGGGGTTCACCATGTTGGCCAGGCTGGTCTC
   ACATAAAAATCATCTCTGCCCCCACCCTCAAGTGGTACAACCGGTCCGACCAGAG

CAP
=====>

                               *****
541 GAACTTCTGACCTCAGATGATCCACCTGCCTCTGCCTCCTAAAGTGCTGGGATTACAGGT
1  CTTGAAGACTGGAGTCTACTAGGTGGACGGAGACGGAGGATTTACGACCCTAATGTCCA

                               *****
601 GTGAGCCACCATGCCAGCTCAGAATTTACTCTGTTTAGAAACATCTGGGTCTGAGGTAG
   CACTCGGTGGTACGGGTCGAGTCTTAAATGAGACAAATCTTTGTAGACCCAGACTCCATC

```

FIGUR 21 (Fortsetzung, 2 von 6)

CCAAT

\*\*\*\*\*&gt;

661 GAAGCTCACCCCACTCAAGTGTGTGGTGTTTTAAAGCCAATGATAGAATTTTTTTATTGT  
CTTCGAGTGGGGTGAGTTCACAACACCACAAAATTCGGTTACTATCTTAAAAAATAACA

721 TGTTAGAACACTCTTGATGTTTTACTGTGATGACTAAGACATCATCAGCTTTTCAAAG  
ACAATCTTGTGAGAACTACAAAATGTGACACTACTGATTCTGTAGTAGTCGAAAAGTTTC

CAP

\*\*\*\*\*&gt;

781 ACACACTAACTGCACCCATAATACTGGGGTGCTTCTGGGTATCAGCGATCTTCATTGAA  
TGTGTGATTGACGTGGGTATTATGACCCACAGAAGACCCATAGTCGCTAGAAGTAACCT

CAP

\*\*\*\*\*&gt;

841 TGCCGGGAGGCGTTTCCTCGCCATGCACATGGTGTTAATTACTCCAGCATAATCTTCTGC  
ACGGCCCTCCGCAAAGGAGCGGTACGTGTACCACAATTAATGAGGTCGTATTAGAAGACG

\*\*\*&gt;

901 TTCCATTTCTTCTCTTCCCTCTTTTAAAATTGTGTTTTCTATGTTGGCTTCTCTGCAGAG  
AAGGTAAAGAAGAGAAGGGAGAAAATTTTAAACACAAAAGATACAACCGAAGAGACGTCTC

CAP

\*\*\*\*\*&gt;

961 AACCAGTGTAAAGCTACAACCTTAACCTTTTGTGGAAACAAATTTTCAAACCGCCCTTTTGC  
TTGGTCACATTCGATGTTGAATTGAAAACAACCTTGTTTAAAAGGTTTGGCGGGGAAACG

1021 CCTAGTGGCAGAGACAATTCACAAACACAGCCCTTTAAAAGGCTTAGGGATCACTAAGG  
GGATCACCGTCTCTGTAAAGTGTGTTGTGTCGGGAAATTTTCCGAATCCCTAGTGATTCC

1081 GGATTTCTAGAAGAGCGACCCGTAATCCTTAAGTATTTACAAGACGAGGCTAACCTCCAG  
CCTAAAGATCTTCTCGCTGGGCATTAGGAATTCATAAATGTTCTGCTCCGATTGGAGGTC

1141 CGAGCGTGACAGCCCAGGGAGGGTGCGAGGCCTGTTCAAATGCTAAGCTTCATAAATAA  
GCTCGCACTGTCGGGTCCCTCCACGCTCCGGACAAGTTTACGATTCTGAAGGTATTTATT

1201 AGCAAATTTCTCCGGCAGTTTCTGGAAAGTAGGAAAGGTTAACATTTAAGGTTGCGTTT  
TCGTTTAAAGGAGGCCGTCAAAGACCTTTCATCCTTTCCAATTGTAAATTTCAAACGCAAA

1261 GTTAGCATTTTCACTGTTTGCCGACCTCAGCTAACAGCATCCCTGCAAGGCCTCGGGAGAC  
CAATCGTAAAGTCACAAACGGCTGGAGTCGATTGTCTGATAGGACGTTCCGGAGCCCTCTG

1321 CCAGAAGTTTCTCGCCCCTTAGATCCAACTTGAGCAACCCGGAGTCTGGATTCTGGGA  
GGTCTTCAAAGAGCGGGGAATCTAGGTTTGAACCTCGTTGGGCCTCAGACCTAAGGACCCT

TopoII

\*\*\*\*\*&gt;

1381 AGTCCTCAGCTGTCCTGCGGTTGTGCCGGGGCCCCAGGCTCTGGAGGGGACCAGTGGCCGT  
TCAGGAGTCGACAGGACGCCAACACGGCCCCGGGTCCAGACCTCCCCTGGTCAACGGCA

1441 GTGGCTTCTACTGCTGGGCTGGAAGTCGGGCCTCCTAGCTCTGCAGTCCGAGGCTTGGAG  
CACCGAAGATGACGACCCGACCTTCAGCCCGGAGGATCGAGACGTCAGGCTCCGAACCTC



FIGUR 21 (Fortsetzung, 3 von 6)

1501 CCAGGTGCCTGGACCCCGAGGCTGCCCTCCACCCTGTGCGGGCGGGATGTGACCAGATGT  
 GGTCACCGGACCTGGGGCTCCGACGGGAGGTGGGACACGCCCGCCCTACACTGGTCTACA  
 1561 TGGCCTCATCTGCCAGACAGAGTGCCGGGGCCAGGGTCAAGGCCGTTGTGGCTGGTGTG  
 ACCGGAGTAGACGGTCTGTCTCACGGCCCCGGGTCCAGTTCCGGCAACACCGACCACAC  
 1621 AGGCGCCCCGGTGCGCGGCCAGCAGGAGCGCCTGGCTCCATTTCCCACCCTTTCTCGACGG  
 TCCGCGGGCCACGCGCCGGTCTGTCTCGCGGACCGAGGTAAAGGGTGGGAAAGAGCTGCC  
 1681 GACCGCCCCGGTGGGTGATTAACAGATATTGGGGTGGTTTGCTCATGGTGGGGACCCCTT  
 CTGGCGGGGCCACCCACTAATTGTCTATAACCCACCAAACGAGTACCACCCCTGGGGAA  
 1741 CGCCGCTGAGAACCTGCAAAGAGAAATGACGGGCCTGTGTCAAGGAGCCCAAGTCGCGG  
 GCGGCGGACTCTTGACGTTTCTCTTTACTGCCCGGACACAGTTCCTCGGGTTCAGCGCC  
 1801 GGAAGTGTGTCAGGGAGGCACTCCGGGAGGTCCCGCGTGCCCGTCCAGGGAGCAATGCGT  
 CCTTCACAACGTCCCTCCGTGAGGCCCTCCAGGGCGCACGGGCAGGTCCCTCGTTACGCA  
 1861 CCTCGGGTTCGTCCCCAGCCGCGTCTACGCGCCTCCGTCTCTCCCTTCACGTCCGGCATT  
 GGAGCCCAAGCAGGGGTGCGCGCAGATGCGCGGAGGCAGGAGGGGAAGTGCAGGCCGTAA  
 1921 CGTGGTGCCCGGAGCCCGACGCCCCGCGTCCGGACCTGGAGGCAGCCCTGGGTCTCCGGA  
 GCACCACGGGCCTCGGGCTGCGGGGCGCAGGCCTGGACCTCCGTGCGGACCCAGAGGCCCT  
 1981 TCAGGCCAGCGGCCAAAGGGTCGCCGCACGCACCTGTTCCAGGGCCTCCACATCATGGC  
 AGTCCGGTCGCCGTTTCCCAGCGCGTGCCTGGACAAGGGTCCCGGAGGTGTAGTACCG  
 2041 CCCTCCCTCGGGTTACCCACAGCCTAGGCCGATTTCGACCTCTCTCCGCTGGGGCCCTCG  
 GGGAGGGAGCCCAATGGGGTGTGCGATCCGGCTAAGCTGGAGAGAGGCGACCCCGGGAGC  
  

Sp1  
 \*\*\*\*\*

 2101 CTGGCGTCCCTGCACCCTGGGAGCGCGAGCGGCGCGGGCGGGGAAGCGCGGCCAGAC  
 GACCGCAGGGACGTGGGACCCTCGCGCTCGCCGCGCGCCCCCCCCCTTCGCGCCGGGTCTG  
 2161 CCCCCGGTCCGCCCCGAGCAGCTGCGCTGTGCGGGCCAGGCCGGGCTCCAGTGGATTG  
 GGGGCCCAGGCGGGCCTCGTCGACGCGACAGCCCCGGTCCGGCCCCAGGGTCACCTAAGC  
 2221 CGGGCAACAGACGCCCAGGACCGCGCTTCCACGTGGCGGAGGGACTGGGGACCCGGGCA  
 GCCCGTTGTCTGCGGGTCTTGGCGCGAAGGGTGCACCGCCTCCCTGACCCCTGGGCCCGT  
  

Sp1  
 =====  
 E2F  
 \*\*\*\*\*

 2281 CCGGTCTTGCCCCCTTCACCTTCCAGCTCCGCCTCGTCCGCGCGGAACCCCGCCCCGTCCC  
 GGCCAGGACGGGAAGTGGAAGGTGAGGCGGAGCAGGCGCGCCTTGGGGCGGGCAGGG  
 2341 GAACCCCTTCCCGGGTCCCCGGGCCAGCCCCCTTCCGGGCCATCCCAGCCCGTCCCGTTCT  
 CTTGGGAAGGGCCAGGGGCCGGGTGCGGGAAGGCCCGGTAGGGTCGGGCAGGGCAAGGA

FIGUR 21 (Fortsetzung, 4 von 6)

```

          Spl
          =====
          E2F                      NFkB
          *****                  *****
2401 TTTCCGCGGCCCCGCCCTCTCCTCGCGGCGCGAGTTTCAGGCAGCGCTGCGTCCTGCTGC
    AAAGGCGCCGGGGCGGGAGAGGAGCGCCGCGCTCAAAGTCCGTCGCGACGCAGGACGACG

    hTERT5'
    *****>
2461 GCACGTGGGAAGCCCTGGCCCCGGCCACCCCCGCGATGCCGCGCGCTCCCCGCTGCCGAG
    CGTGACCCCTTCGGGACCGGGGCCGGTGGGGGCGCTACGGCGCGCGAGGGGCGACGGCTC

2521 CCGTGCGCTCCCTGCTGCGCAGCCACTACCGCGAGGTGCTGCCGCTGGCCACGTTCTGTGC
    GGCACGCGAGGGACGACGCGTCCGTGATGGCGCTCCACGACGGCGACCGGTGCAAGCACG

                                          E2F
                                          *****
2581 GGCGCCTGGGGCCCCAGGGCTGGCGGCTGGTGCAGCGCGGGGACCCGGCGGCTTTCCGCG
    CCGCGGACCCCGGGTCCCGACCGCCGACCACGTGCGCGCCCTGGGCCCGCGAAAGGCGC

    *
2641 CGCTGGTGGCCCAGTGCCCTGGTGTGCGTGCCCTGGGACGCACGGCCGCCCGCGCGCC
    GCGACCAACCGGGTCACGGACCACACGCACGGGACCCTGCGTGCCGGCGGGGGCGGGCGGG

          NFkB
          =====
          *****
2701 CCTCCTTCGCGCCAGGTGGGCCTCCCGGGGTCGGCGTCCGGCTGGGGTTGAGGGCGGCCG
    GGAGGAAGGCGGTCCACCCGGAGGGGCCCCAGCCGCGAGGCCGACCCCACTCCCGCCGGC

                                          Topo_II_cleavag
                                          :::::::::::
                                          NFkB
                                          ++++++++
                                          NFkB
                                          =====

    Intron1
    *****>
2761 GGGGGAACCAGCGACATGCGGAGAGCAGCGCAGGCGACTCAGGGCGCTTCCCCCGCAGGT
    CCCCCTTGGTCGCTGTACGCCTCTCGTCGCGTCCGCTGAGTCCCGCGAAGGGGGCGTCCA

    e_site
    ::::
2821 GTCCTGCCTGAAGGAGCTGGTGGCCCCGAGTGCTGCAGAGGCTGTGCGAGCGCGGCGCGAA
    CAGGACGGACTTCCTCGACCACCGGGCTCACGACGTCTCCGACACGCTCGCGCCGCGCTT

2881 GAACGTGCTGGCCTTCGGCTTCGCGCTGCTGGACGGGGCCCGGGGGCCCCCGAGGC
    CTTGCACGACCGGAAGCCGAAGCGCGACGACCTGCCCCGGGCGCCCCGGGGGGGCTCCG

2941 CTTCAACCACCAGCGTGCGCAGTACCTGCCCAACACGGTGACCGACGCACTGCGGGGGAG
    GAAGTGGTGGTCGCACGCGTCGATGGACGGGTTGTGCCACTGGCTGCGTGACCCCCCTC

```

FIGUR 21 (Fortsetzung, 5 von 6)

3001 CGGGGCGTGGGGGCTGCTGCTGCGCCGCGTGGGCGACGACGTGCTGGTTACCTGCTGGC  
 GCGCGCACCCCGACGACGACGCGCGCACCCGCTGCTGCACGACCAAGTGGACGACCG  
 3061 ACGCTGCGCGCTCTTTGTGCTGGTGGCTCCCAGCTGCGCCTACCAGGTGTGCGGGCCGCC  
 TGCGACGCGCGAGAAACACGACCACCGAGGGTCGACGCGGATGGTCCACACGCCCCGGCGG  
 3121 GCTGTACCAGCTCGGCGCTGCCACTCAGGCCCCGCCCCGCCACACGCTAGTGGACCCCG  
 CGACATGGTTCGAGCCGCGACGGTGAGTCCGGGCGGGGGCGGTGTGCGATCACCTGGGGC  
 3181 AAGGCGTCTGGGATGCGAACGGGCGCTGGAACCATAGCGTCAGGGAGGCCGGGGTCCCCCT  
 TTCCGCGAGACCCTACGCTTGCCCGGACCTTGGTATCGCAGTCCCTCCGGCCCCAGGGGGA  
 3241 GGGCCTGCCAGCCCCGGGTGCGAGGAGGCGCGGGGCGAGTGCCAGCCGAAGTCTGCCGTT  
 CCGGACGGTCGGGGCCACGCTCCTCCGCGCCCCCGTCACGGTCGGCTTCAGACGGCAA  
 3301 GCCAAGAGGCCCAGGCGTGCGCTGCCCCTGAGCCGAGCGGACGCCCCGTTGGGCAGGG  
 CGGGTTCTCCGGGTCCGACCGCGACGGGACTCGGCCTCGCCTGCGGGCAACCCGTCCC  
 3361 GTCCTGGGCCCCACCGGGCAGGACGCGTGACCGAGTGACCGTGGTTTCTGTGTGGTGTC  
 CAGGACCCGGGTGGGCCCCGTCTGCGCACCTGGTCACTGGCACCAAGACACACCACAG  
 3421 ACCTGCCAGACCCGCGAAGAAGCCACCTCTTTGGAGGGTGCCTCTCTGGCACGCGCCA  
 TGGACGGTCTGGGCGGCTTCTTCGGTGAGAAACCTCCACGCGAGAGACCGTGCCGGT  
 3481 CTCCCACCCATCCGTGGGCCGCCAGCACCGCGGGCCCCCATCCACATCGCGGCCACC  
 GAGGTTGGGTAGGCACCCGGCGGTGCTGGTGCGCCGGGGGTAGGTGTAGCGCCGGTGG  
 3541 ACGTCCCTGGGACACGCCTTGTCCCCGGTGACGCCGAGACCAAGCACTTCCTCTACTC  
 TGCAGGGACCTGTGCGGAACAGGGGGCCACATGCGGCTCTGGTTCGTGAAGGAGATGAG  
 3601 CTCAGGCGACAAGGAGCAGCTGCGGCCCTCCTTCTACTCAGCTCTCTGAGGCCCAGCCT  
 GAGTCCGCTGTTCTCGTCGACGCCGGGAGGAAGGATGAGTCGAGAGACTCCGGGTCGGA  
 3661 GACTGGCGCTCGGAGGCTCGTGAGACCATCTTTCTGGGTTCCAGGCCCTGGATGCCAGG  
 CTGACCGCGAGCCTCCGAGCACCTCTGGTAGAAAGACCCAAGGTCCGGGACCTACGGTCC  
 3721 GACTCCCCGAGGTTGCCCCGCTGCCCCAGCGCTACTGGCAAATGCGGCCCCCTGTTTCT  
 CTGAGGGGCGTCCAACGGGGCGGACGGGGTCGCGATGACCGTTTACGCCGGGGACAAAGA  
 3781 GGAGCTGCTTGGGAACCACGCGCAGTGCCCCCTACGGGGTGCTCCTCAAGACGCACTGCCC  
 CCTCGACGAACCCCTTGGTGCGCGTCACGGGGATGCCCCACGAGGAGTTCTGCGTGACGGG  
 3841 GCTGCGAGCTGCGGTCACCCCAGCAGCCGGTGTCTGTGCCCGGGAGAAGCCCCAGGGCTC  
 CGACGCTCGACGCCAGTGGGGTCGTGCGCCACAGACACGGGCCCTCTTCGGGGTCCCGAG  
 3901 TGTGGCGGCCCCCGAGGAGGAGGACACAGACCCCCGTGCGCTGGTGACGTGCTCCGCCA  
 ACACCGCGGGGGCTCCTCCTCTGTGTCTGGGGGACGCGGACCACGTGACGAGGCGGT  
 3961 GCACAGCAGCCCCCTGGCAGGTGTACGGCTTCGTGCGGGCCTGCCTGCGCCGGGTGGTGCC  
 CGTGTCGTGCGGGACCGTCCACATGCCGAAGCACGCCCCGACGGACGCGGCCGACCACGG  
 4021 CCCAGGCCTCTGGGGCTCCAGGCACAACGAACGCCGCTTCCTCAGGAACACCAAGAAGTT  
 GGGTCCGGAGACCCCGAGGTCCGTGTTGCTTGCGGCGAAGGAGTCCTTGTGGTTCTTCAA

FIGUR 21 (Fortsetzung, 6 von 6)

4081 CATCTCCCTGGGGAAGCATGCCAAGCTCTCGCTGCAGGAGCTGACGTGGAAGATGAGCGT  
GTAGAGGGACCCCTTCGTACGGTTCGAGAGCGACGTCCTCGACTGCACCTTCTACTCGCA

\*\*\*\*\*

4141 GCGGGACTGCGCTTGGCTGCGCAGGAGCCCAGGTGAGGAGGTGGTGGCCGTCGAGGGCCC  
CGCCCTGACGCGAACCGACGCGTCCTCGGGTCCACTCCTCCACCACCGGCAGCTCCCGGG

Intron2

\*\*\*\*\*

4201 AGGCCCCAGAGCTGAATGCAGTAGGGGCTCAGAAAAGGGGGCAGGCAGAGCCCTGGTCCT  
TCCGGGGTCTCGACTTACGTCATCCCCGAGTCTTTTCCCCCGTCCGTCTCGGGACCAGGA

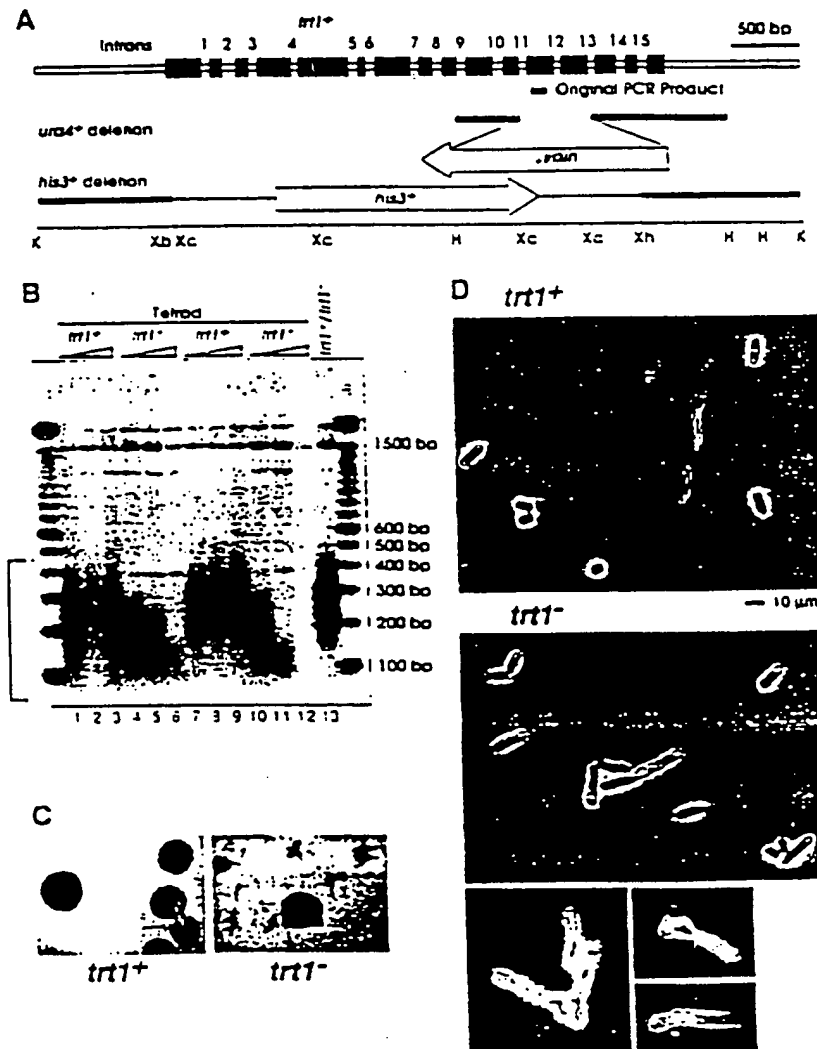
\*\*\*\*\*

4261 CCTGTCTCCATCGTCACGTGGGCACACGTGGCTTTTCGCTCAGGACGTCGAGTGGACACG  
GGACAGAGGTAGCAGTGCACCCGTGTGCACCGAAAAGCGAGTCCTGCAGCTCACCTGTGC

\*\*\*\*\*>

4321 GTGATCGAGGTGCGAC  
CACTAGCTCCAGCTG

Figur 22



FIGUR 23  
EST AA281296  
(Seq. ID. No. 8)

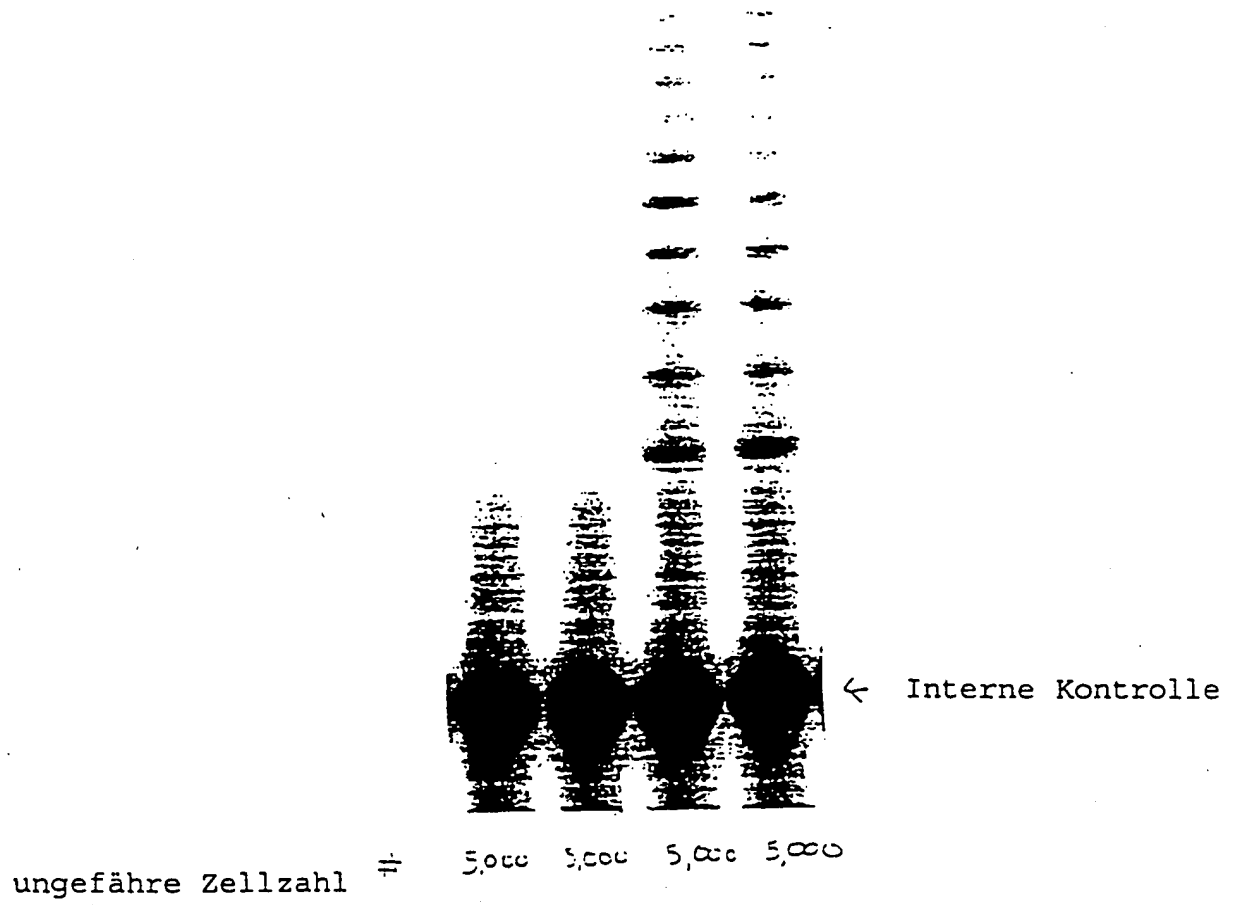
gc  
caagttcctg cactggctga tgagtgtgta cgtcgtcgag ctgctcaggt ctttctttta  
tgtcacggag accacgtttc aaaagaacag gctctttttc taccggaaga gtgtctggag  
caagttgcaa agcattggaa tcagacagca cttgaagagg gtgcagctgc gggacgtgtc  
ggaagcagag gtcaggcagc atcgggaagc caggccccgcc ctgctgacgt ccagactccg  
cttcatcccc aagcctgacg ggctgcggcc gattgtgaac atggactacg tcgtgggagc  
cagaacgttc cgcagagaaa agagggccga gcgtctcacc tcgaggggtga aggcactgtt  
cagcgtgctc aactacgagc gggcgcg

FIGUR 24  
(Seq. ID. No. 9)

TCTACCTTGACAGACCTCCAGCCGTACATGCGACAGTTCGTGGCTCACCTGCAGGAG  
ACCAGCCCGCTGAGGGATGCCGTCGTCATCGAGCAGAGCTCCTCCCTGAATGAGGC  
CAGCAGTGGCCTCTTCGACGTCTTCCTACGCTTCATGTGCCACCACGCCGTGCGCAT  
CAGGGGCAAGTC

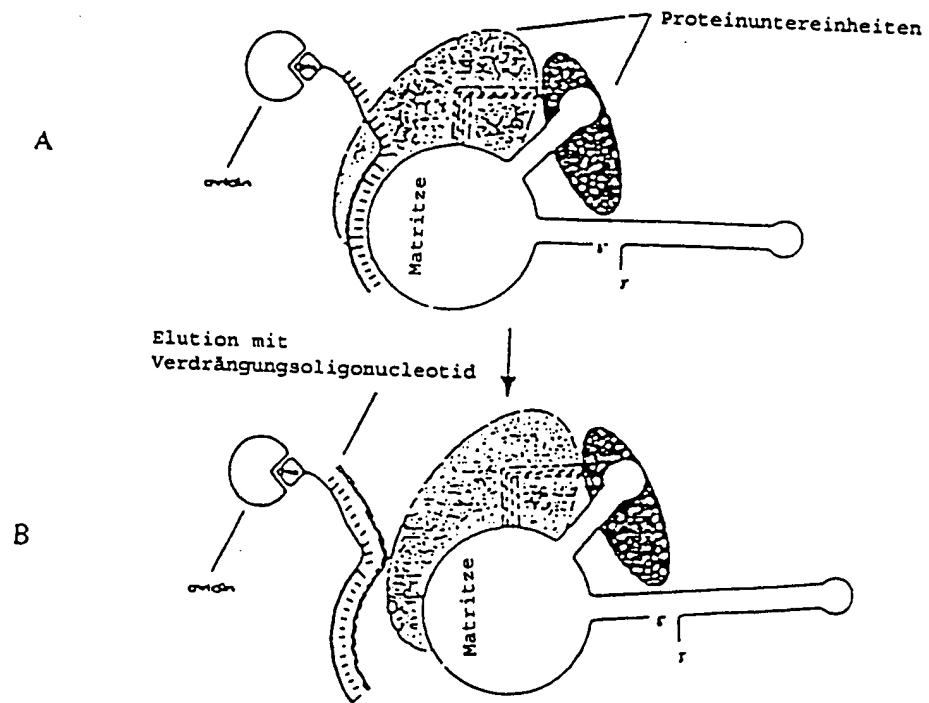
Figur 25

pBS212 pGRN133

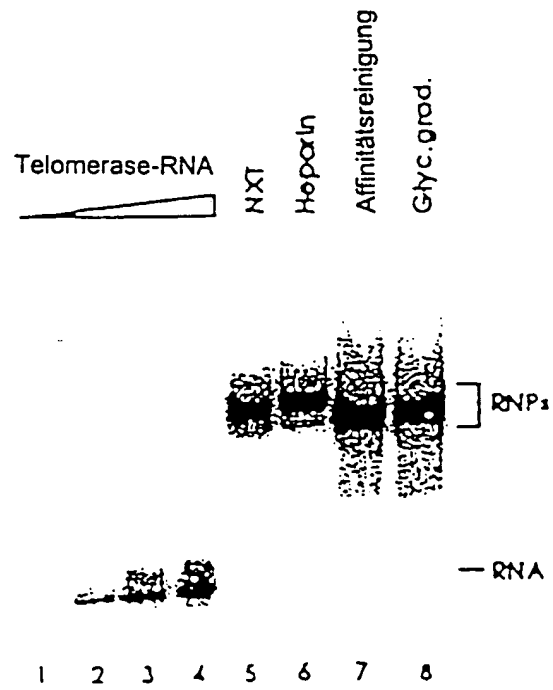




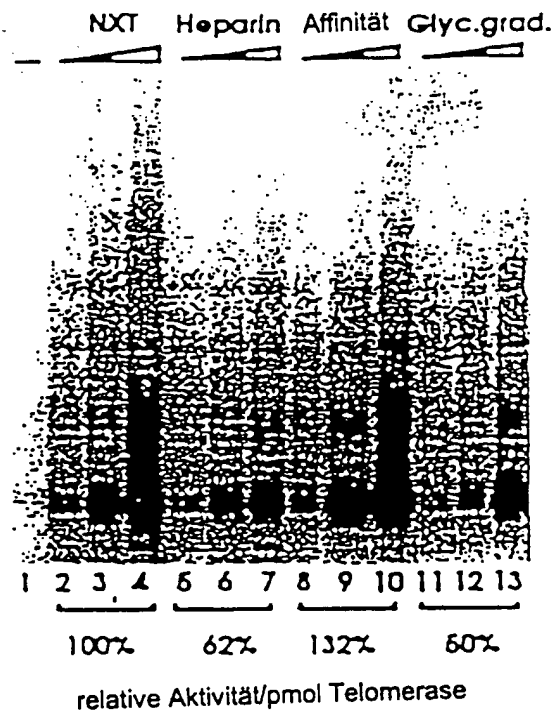
Figur 26



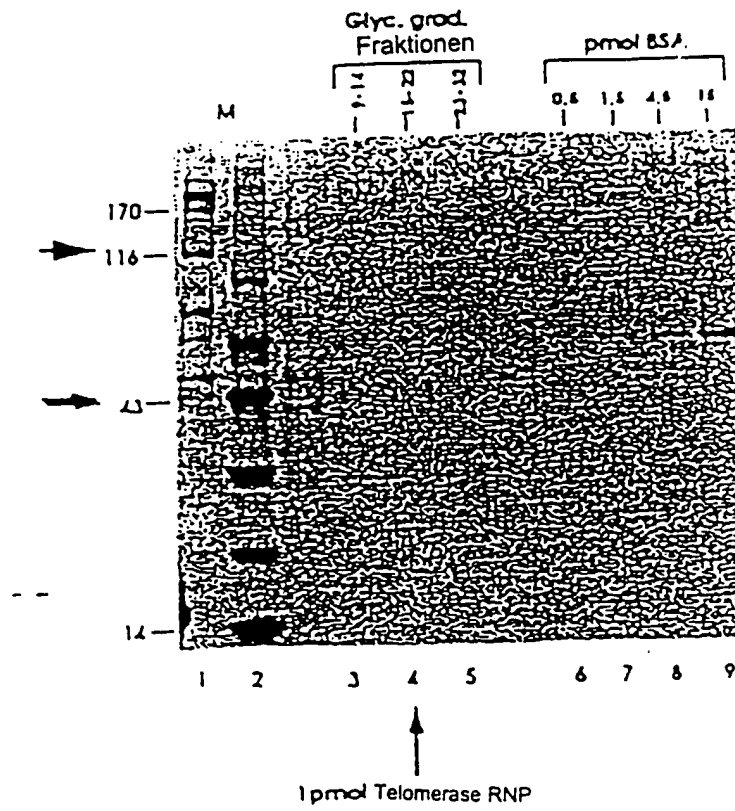
Figur 27



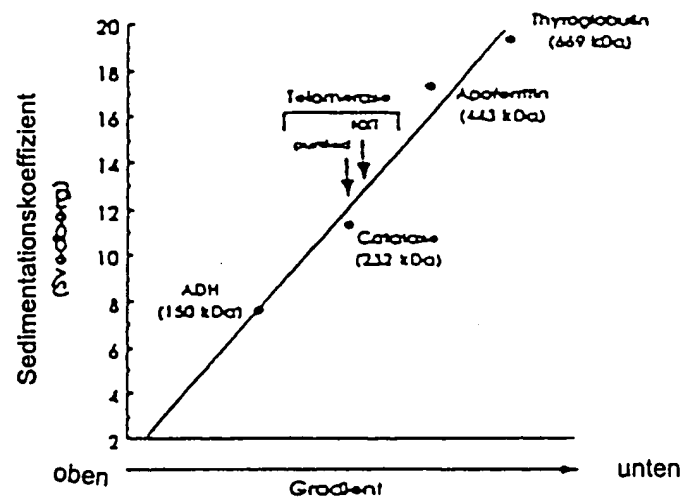
Figur 28



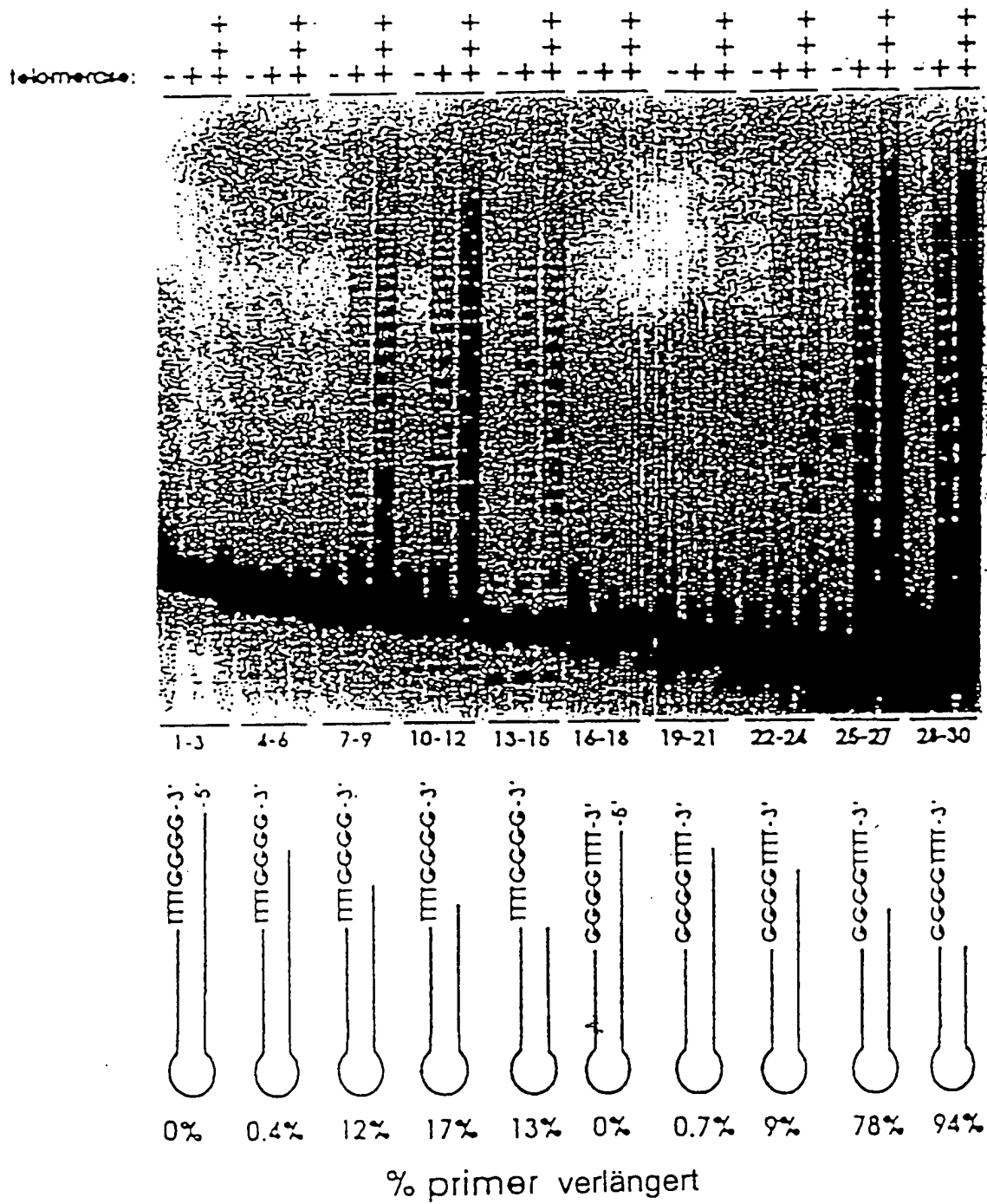
Figur 29



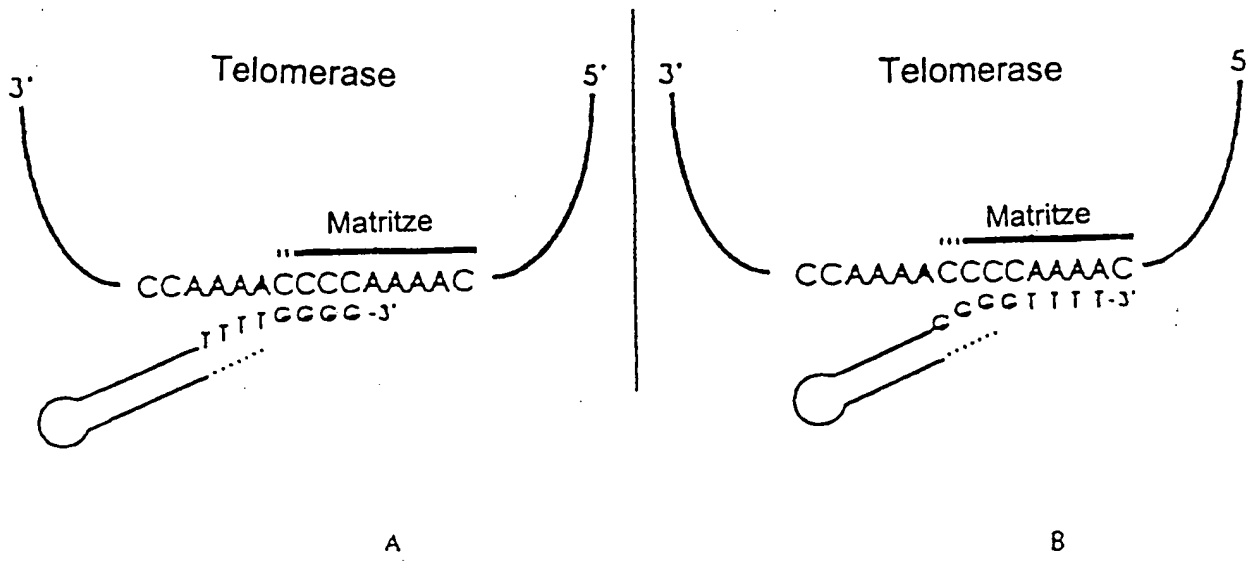
Figur 30



Figur 31



Figur 32



Figur 33





Figur 34

```

1  CCCCCAAACC CCAAAACCCC AAAACCCCTA TAAAAAAAGA AAAAATTGAG
51  GTAGTTTAGA AATAAAATAT TATTCCCGCA CAAATGGAGA TGGATATTGA
101 TTTGGATGAT ATAGAAAATT TACTTCCTAA TACATTCAAC AAGTATAGCA
151 GCTCTTGTAG TGACAAGAAA GGATGCAAAA CATTGAAATC TGGCTCGAAA
201 TCGCCTTCAT TGA CTATTCC AAAGTTGCAA AAACAATTAG AGTTCTACTT
251 CTCGGATGCA AATCTTTATA ACGATTCTTT CTTGAGAAAA TTAGTTTTAA
301 AAAGCGGAGA GCAAAGAGTA GAAATTGAAA CTTACTAAT GTTTAAATAA
351 AATCAGGTAA TGAGGATTAT TCTATTTTTT AGATCACTTC TTAAGGAGCA
401 TTATGGAGAA AATTACTTAA TACTAAAAGG TAAACAGTTT GGATTATTTT
451 CCTAGCCAAC AATGATGAGT ATATTAAATT CATATGAGAA TGAGTCAAAG
501 GATCTCGATA CATCAGACTT ACCAAAGACA AACTCGCTAT AAAACGCAAG
551 AAAAAGTTTG ATAATCGAAC AGCAGAAGAA CTTATTGCAT TTA CTATTTCG
601 TATGGGTTTT ATTACAATTG TTTTAGGTAT CGACGGTGAA CTCCCGAGTC
651 TTGAGACAAT TGAAAAAGCT GTTTACA ACT GAAGGAATCG CAGTTCTGAA
701 AGTTCTGATG TGTATGCCAT TATTTTGTGA ATTAATCTCA AATATCTTAT
751 CTAATTTAA TGGATAGCTA TAGAAACAAA CCAAATAAAC CATGCAAGTT
801 TAATGGAATA TACGTAAAT CCTTTGGGAC AAATGCACAC TGAATTTATA
851 TTGGATTCTT AAAGCATAGA TACACAGAAT GCTTTAGAGA CTGATTTAGC
901 TTACAACAGA TTACCTGTTT TGATTACTCT TGCTCATCTC TTATATCTTT
951 AAAAGAAGCA GCGGAAATGA AAAGAAGACT AAAGAAAGAG ATTTCAAAAT
1001 TTGTTGATTC TTCTGTAACC GGAATTAACA ACAAGAATAT TAGCAACGAA
1051 AAAGAAGAAG AGCTATCACA ATCCTGATTC TTAAAGATTT CAAAAATTCC
1101 AGGTAAGAGA GATACATTCA TTA AAATTCA TATATTATAG TTTTTCATTT
1151 CACAGCTGTT ATTTTCTTTT ATCTTAACAA TATTTTTTGA TTAGCTGGAA
1201 GTAAAAAGTA TCAATAAGA GAAGCGCTAG ACTGAGGTAA CTTAGCTTAT
1251 TCACATTCAT AGATCGACCT TCATATATCC AATACGATGA TAAGGAAACA
1301 GCAGTCATCC GTTTTAAAAA TAGTGCTATG AGGACTAAAT TTTTAGAGTC
1351 AAGAAATGGA GCCGAAATCT TAATCAAAAA GAATTGCGTC GATATTGCAA
1401 AAGAATCGAA CTCTAAATCT TTCGTTAATA AGTATTACCA ATCTTGATTG
1451 ATTGAAGAGA TTGACGAGGC AACTGCACAG AAGATCATTA AAGAAATAAA
1501 GTAACTTTTA TTAATTAGAG AATAAACTAA ATTACTAATA TAGAGATCAG
1551 CGATCTTCAA TTGACGAAAT AAAAGCTGAA CTAAAGTTAG ACAATAAAAA
1601 ATACAAACCT TGGTCAAAAT ATTGAGGAAG GAAAAGAAGA CCAGTTAGCA
1651 AAAGAAAAAA TAAGGCAATA AATAAAATGA GTACAGAAGT GAAGAAATAA
1701 AAGATTTATT TTTTCAATA ATTTATTGAA AAGAGGGGTT TTGGGGTTTT
1751 GGGGTTTTGG GG

```

Figur 35

```

CCCCAAAACCCAAAACCCAAAACCCCTATAAAAAAGAAAAATTGAGGTAGTTTGA
-----
1  GCGGTTTTGCGGTTTTGCGGTTTTGCGGATATTTTTTCTTTTTTAACTCCATCAATCT 60
a  P O N P K T P K P L . K K K K L R . F R -
b  P K T P K P O N P Y K K R K N C G S L E -
c  P K P O N P K T P I K K E K I E V V . K -

AATAAAATATTATCCCGCACAAATGGAGATGCATATTGATTTGGATGATATAGAAAA
-----
61  TTATTTTATAATAAGGCGTGTACCTCTACCTATAACTAAACCTACTATATCTTTAA 120
a  N K I L F P H K W R W I L I W H I . K I -
b  I X Y Y S R T N G D G Y C F C G . Y R K F -
c  . N I I ? A O H E M D I D L D D I E N L -

TACTTCCTAATACATTCAACAAGTATAGCAGCTCTTGTAGTCACAAGAAAGGATGCAAAA
-----
121  ATGAAGGATTATGTAAGTTGTTTCATATCGTCGAGAACATCACTGTTCTTTCTACGTTTT 180
a  Y F L I H S T S I A A L V V T R K D A K -
b  T S . Y I O Q V . O L L . . O E R H Q N -
c  L P N T P N K Y S S S C S D K K Q K T -

CATTGAAATCTGCTCGAAATCGCCTTCATTGACTATTCCAAAGTTGCAAAAACAATTAG
-----
181  GTAACTTTAGACCGAGCTTTACCGGAAGTAAGTATAAGCTTTCAACGTTTTTCTTAATC 240
a  H C N L A R N R L H C L F O S C K N N . -
b  I E I W L E ! A F I D Y S K V A K T I R -
c  L K S G S K S P S L T I P K L O K Q L E -

AGTTCTACTTCTCGCATCCAAATCTTTATAACGATTCTTTCTTGACAAAATTAGTTTTAA
-----
241  TCAAGATGAGAGCCCTACGTTTAGAAATATTCTTAAGAAAGAACTCTTTTAATCAAAATT 300
a  S S T S R M O I F I T I L S C E N . F . -
b  V L L L C C K S L . R F F L E K I S F K -
c  P Y F S D A N L Y N D S P L R K L V L K -

AAAGCCGAGACCAAGAGTAGAAATTGAAACATTACTAATGTTTAAATAAAATCAGGTAA
-----
301  TTTCCGCTCTCGTTTCTCATCTTTAACTTTCTAATGATTACAAATTTATTTTACTCCATT 360
a  K A E S K E . X L K H Y . C L N K I R . -
b  K R R A K S R N C N I T N V . I X S G N -
c  S G E O R V E I E T L L H F R . N O V H -

TGAGGATTATTCTATTTTTAGATCACTTCTTAAGGAGCATTATCGACAAAATTACTTAA
-----
361  ACTCCTAATAAGATAAAAAATCTAGTCAAGAATTCCTCCTAATACCTCTTTTAATGAATT 420
a  C G L F Y F L O H F L R S I M E K I T . -
b  E D Y S I F . I T S . G A L W R K L L N -
c  R I I L F F R S L L K E H Y G E N Y L I -

TACTAAAACGTAAACAGTTTGGATTATTTCCCTAGCCAAACAATGATGACTATATTAATT
-----
421  ATGATTTTCCATTTGTCAAACCTAATAAAGCGATCGCTTGTACTACTCATATAATTAA 480
a  Y . K V N S L D Y F P S Q O C C V Y . I -
b  T K R . T V W I I S L A N N D E Y I K F -
c  L K C X O F C L F P . P T M H S I L N S -

```

Figur 35 (Fortsetzung)

```

CATATGAGAAAGACTCAAGGATCTCGATACATCAGACTTACCAAGACAAAACCTCGTAT
481 ----- 540
GTATACTCTTACTCAGTTTCTAGACCTATGTAGTCTGAATGGTTTCTGTTTGAGCCGATA

a H M R M S Q R I S I H O T Y Q R O T R Y -
b I C E C V K C S R Y I R L T K D K L A I -
c Y E N E S K D L D T S D L P K T N S L -

AAAAAGCAAGAAAGTTTGATAATCGAACAGCAGAAGAACTTATTGCAATTTACTATTCC
541 ----- 600
TTTTCGGTTCTTTTCAAACTATTAGCTTGTCTGCTTCTTGAATAACGTAATGATAAGC

a K T O E K V C S N S R R T Y C I Y Y S -
b K R X K X F D N R T A E E L I A F T I R -
c N A R K S L I I E O O K N L L H L L F V -

TATCGGTTTATTACAATTGTTTTAGCTATCGACGGTGAACCTCCCGAGCTTTGAGACAAT
601 ----- 660
ATACCAAAAATAATGTTAACAAAATCCATAGCTGCCACTTGAGGGCTCAGAACTCTGTTA

a Y G F Y Y N C F R Y R R C T P E S C D N -
b H G F I T I V L C I D G E L P S L E T I -
c W V L L Q L F V S T V N S R V L R Q L -

TGAAAAAGCTGTTTACAAGTGAAGGAATCCGAGTTCTGAAAGTTCTGATGCTATGCCAT
661 ----- 720
ACTTTTTCGACAAATGTTGACTTCTTACCGTCAAGACTTTCAAGACTACACATACCGTA

a C K S C L Q L K E S Q F C K F C V C H -
b E K A V Y N C R N R S S S E S S D V Y A I -
c K K L F T T E C I A V L K V L H C H P L -

TATTTTGTGAATTAAATCTCAATATCTTATCTCAATTTAATGGATAGCTATAGAAACAA
721 ----- 780
ATAAAACACTTAATTAGAGTTTATAGAATAGAGTTAAATTACCTATCGATATCTTTGTTT

a Y F V N S Q I S Y L N L M D S Y R N K -
b I L C I N L K Y L I S I W I A I E T N -
c F C E L I S N I L S O F N C L K Q T -

CCAAATAAACCATCGAAGTTTAAATGGAATATACGTTAAATCCTTTGGGACAAATGCACAC
781 ----- 840
CGTTTATTTGCTAGCTTCAAAATTACCTTATATGCAATTTAGGAAACCTGTTTACGCTG

a P N X P C A F N C I Y V K S F C T N A H -
b O I N M A S E M E Y T L N P L C O M H T -
c X T T Q V W N I R I L W D K C T L -

TGAAATTTATATCGATTCTTAAAGCATAGATACACAGAATGCTTTAGAGACTGATTAGC
841 ----- 900
ACTTATATATACCTAAGATTTCGTATCTATGCTGCTTACGAAATCTCTGACTAAATCG

a C I Y I C F L K H R Y T E C F R D C F S -
b E F I L D S S I D T O N A L E T D L A -
c N L Y W I L K A I H R M L R L I L -

TTACAACAGATTACCTGTTTTCATTACTCTTCTCATCTCTTATATCTTTAAAGAAGCA
901 ----- 960
AATGTTCTCTAATCGACAAAACCTAATGAGAAGGACTAGAGAATATAGAAATTTTCTCTT

a L O O I T C F D Y S C S S L I S L K E A -
b Y N R L P V L I T L A H L L Y L K K O -
c T T D Y L F C L L L I S Y I F K R S R -

CCCCAAATCAAGAAAGACTAAAGAAAGAGATTTCAAAATTTGTTGATTCTTCTGTAACC
961 ----- 1020
CCGCTTACTTTCTTCTGATTCTTTCTCTAAAGTTTAAACAACTAAGAAGACATTCC

a C E H R R R L K K E I S K F V D S S V T -
b A X C K E D R K R F O N L L I L L P -
c R N E K X T K E R D F K I C C F F C N R -

CGAATTAACACAAAGAAATATTACCAACCAAAAGAAAGAGCTATCACAATCCTGATT
1021 ----- 1080
CCTTAATGTTCTCTCTTAAATCGTTGCTTTTCTTCTTCTCGATAGCTTACGACTAAG

a C I N N K N I S N E K E E L S O S C F -
b E L T T R I A T K K K K S Y H N P D S -
c N O D E Y O P K R R R A I T I L I L -

```

Figur 35 (Fortsetzung)

1031 TTAAAGATTTCAAAAATTCAGGTAAGACAGATACATTTCATTAATAATTCATATATTATAG 1140  
 AATTTCATAAGTTTTTAAGGTCCATTCTCTCTATCTAAGTAATTTTAAGTATATAATATC  
 L K I S K I P C K R D T F I K I H I L .  
 R F O K F Q V R E I H S L K F I Y Y S .  
 K D F X N S R . E R Y I H . N S Y I I V .  
 1141 TTTTCATTTCACAGCTGTTATTTCTTTTATCTTAACAATATTTTTTCATTAGCTCGAA 1200  
 AAAAAGTAAAGTGTGACAAATAAAAGAAAAATACAATGTTATAAAAACTAATCGACCTT  
 F F I S O L L F S F I L T I F F D . L E .  
 F S F H S C Y F L L S . Q Y F L I S W K .  
 F H F T A V I F F Y L N N I F C L A C S .  
 1201 CTAAAAAGTATCAATAAGAGAAGCGCTAGACTCAGGTAACCTTAGCTTATTCACATTAT 1260  
 CATTTTCATAGTTTATTCTCTTCGGATCTGACTCCATTGAATCGAATAAGTGAAGTA  
 V K S I K . E K R . T E V T . L I H I H .  
 K V S N X R S A R L R . L S L F T F I .  
 K K Y Q I R E A L O C G N L A Y S H S .  
 1261 AGATCGACCTTCATATATCCAATACGATGATAAGGAAACAGCAGTCATCCGTTTTAAAA 1320  
 TCTAGCTGGAAGTATATAGGTTATGCTACTATTCCTTTCTCTCAGTAGCGAAAAATTTT  
 R S T F I Y P I R C . G N S S H P F . K .  
 O R P S Y I O Y O O K E T A V I R F K N .  
 I O L H I S N T H I R K O O S S V L K I .  
 1321 TAGTCTATCAGCACTAAATTTTACAGCTCAACAAATCGACCCGAAATCTTAATCAAAA 1380  
 ATCAGGATACTCCTGATTTAAAAATCTCAGTTCTTTACCTCGGCTTTAGAATTAGTTTT  
 C Y E D . I F R V K K W S R N L N O K .  
 S A M R T K F L E S R N G A E I L I K K .  
 V L C C L N F . S O E H E P K S . S K R .  
 1381 GAATTCGCTCATATTCGCAAAAGAACTCGAACTCTAAATCTTTCTTAAATAAGTATTACCA 1440  
 CTTAACCGCAGCTATAACGTTTTCTTAGCTTGAGATTTAGAAAGCAATTATTCAATAATGCT  
 E L R R Y C K R I E L . I F R . V L P .  
 N C V D I A K E S N S K S F V N X Y Y O .  
 I A S I L O K N R T L N L S L I S I T N .  
 1441 ATCTTCATTGATTGACAGATTGACGAGCCAACTCCACAGAAGATCATTAAAGAAATAAA 1500  
 TAGAACTAACTAACTTCTTAAGTCTGCTGCTGCTGCTTCTTCTAGTAATTTCTTTATTT  
 I L I D C R D . R C N C T E D H . R N K .  
 S C L I E E I D E A T A O K I I K E I K .  
 L D C L X R L T R O L H R R S I K K . S .  
 1501 CTAACTTTTATTAAATTAGAGAATAAACTAAATTACTAATATAGAGATCAGCGATCTTCAA 1560  
 CATTGAAAAATATTAAATCTCTTATTTGATTAAATGATTATATCTCTAGTCGCTAGAACTT  
 V T F E H . R I N . I T N I E I S D L O .  
 L L L I R E . T K L L I . R S A I F N .  
 N F Y . L E N K L N Y . Y R O O R S S I .  
 1561 TTCACGAAATAAAGCTCAACTAAAGTTAGACAATAAAAAATACAACCTTGCTCAAAAT 1620  
 AACTGCTTTATTTTCGACTTGATTCAATCTGTTATTTTATGTTTGGACCCAGTTTTA  
 L T K . X L N . S . T I K N . T H L G O N .  
 C R N X S C T K V R O . K . O T L V K I .  
 O E I X A E L K L D N X K Y K P W S K Y .  
 1621 ATTCAGCAAGCAAGACAGCAGTTAGCAAAAGAAAAATAAGCCCAATAAATAAATGA 1680  
 TAACTCCTTCCTTTCTCTGCTCAATCGTTTTCTTTTTTATTCGCTTATTTATTTACT  
 I E E C K E O O L A K E K I R O . I X C .  
 L R K E K K T S . O K K K . G N X . N E .  
 C C R X R R P V S K R X N X A I N K H S .

Figur 35 (Fortsetzung)

```

1681  GTACAGAAGTGAAGAAATAAAAGATTTATTTTTCATAATTATTGAAAACAGCGCTT
----- 1740
      CATCTCTTCACTTCTTTATTTTCTAAATAAAAAAAGTTATTAAATAACTTTTCTCCCAA

      V Q K C R N K R F I F F N N L L K R G V .
      Y R S E E I K D L F F S I I Y C K E C F .
      T E V K X . K I Y F F Q . F I E K R C F .

      TTGCGCTTTTCCCGCTTTTCCCG
1741 ----- 1762
      AACCCCAAAACCCCAAAACCCC

      L G F W C F C .
      W C F G V L C .
      G V L C F W .

```

Figur 36

```

2  EVDIENAOADNHGHSALKTCEEIKZAKTLYSWIQVIRCRNOSQSHYKDL 51
19 ELELEMOENQNOIOVRVK...IDOPKQY...LVNVTAAACLLQEGSYOOK 62
52 EDIXIFAOTNIWATPROYNEDFKVIARKEVF...STGLMIELIDKCLVELL 100
51 DERRVITKALL...EVAESDPEFICOLAVYIRNELYIRTTTNYIVAF... 107
101 SSEDVSOROKLOCFCFOLXGNOLAXTHLLTALSTOKOYFFODEWNOVRAH 150
103 CVVHKNTOPFIEKYFNKAVLLPNOLLEVCEFAOVLYI 144
151 IGNEIFRHLTYNYLIFORTSECTLVFCGNVFDHLKVNDKFDKKOKGGA 200
145 FOATEFKNLY...LDRILSODIRKELTFRKCLORCVRSKF 181
201 ADHNE PRCSTCKYNVKNKDHFLNNINVPNNMMKSRTRIFYCTHF 247
132 SEFNEYOLCKYCTES...QRKKTFRYLSVTNKOKWQOTKKK... 220
248 NRNNQFFKKHEFVSNKNNISAMDRAOTIFTNIFRFRIRKXKDKVIEKI 297
221 RKENLLTKLOAIKXESDKSKRETG...DIMVVEDAIKALKPAVMKKI 254
298 AYHLEKXKDFNFNYLTSCPLPENWRERKOKIENLINKTREEKSKYYEE 347
255 AKRONAMK...KHKKAPKIPNSTLESKYLTFKD 294
348 LFSYTONKCVTOFINEFFYNILPKDFTGRNRKQFQKKVKKYVELNKHE 397
295 LIXTCHISEP...KERVYKILCKKYPKTESEYKAAFGDSASAPFN...PE 338
398 LIHXNLLLEKINTREISWMOVETSAXHFFYFDHENIYVLWKLRLWIFEDL 447
339 LACKMKXIEISKTEWELSAKGNTAEVWDLISSNOLPYMAHLRNLN... 386
448 VVSLIRCFFYVTEOOKSYSKTYYYRKNWDMVIMHISIADLKKETLAEVQE 497
337 ILKACVSD... 394
498 KEVEEWKSLCFAPCKLRLIPKXTTFRPIHTFNKKIVNSDRKTKLTTNT 547
395 TTHS 398
548 KLLNSHLMLKTLKXRMFKOPFCFAVENYDOVHKKYEZFVCKWKQVOPKL 597
399 IVINK...ICEPKAVENSKH 415
598 FFATMDIEKCYDSVWREKSTFLKTTKLLSSDFWIHTAQILKRRKNIVID 647
416 P PLOFFSAIEAVN...EAVTKCFKAKK...RENNMLKGOIEAVKE...VVE 457
648 SKNFRKKEHKDYFROKFOKIALEGGQYPTLFSVLENEQDNLNAKKT LIVE 697
458 KTDEEKDH...ELEOTECEGFVKVNEGIGKQYINSIELAIK 496
598 AKQRYFKKDNLLQPVINICQYNYINFNGKFYKQTKCIPQGLCVSSILS 747
497 IAVNKNLDEIKGHTAIFSDVSGSHSTSHSGGAKKYGSVRTCLECALVLGL 545
748 FYYATLEESSLGLRDESHNPNPNVLLHRLTDDYLLITTOENNAVLFI 797
547 MKVORCEKSSFYIFSSPSSOCNKCYLEVOL... 576
798 EKLINVSRENGFKFMKK...LOTSFPLSPSKFAKYGHDSVEEQNIVQDYCD 846
577 PCDELRP SHOKLLOEKCKLGGG...TOFPYECIDETKXKTHVD 617
847 WIGISIDHKTALHPNINLRIEGILCTLNLNMOTKKASHMLKKKLSFLH 896
618 NIVLSOMHIAECYSDINVRGSSIVNSI...KKYKDEVN 653
897 MNITHYFRKTITTEDFANKTLNKLIFSGGYKHOCakeYKO...HFKKNLAM 945
554 PHIKIF...AVDLECYG...KCLNLGDEFNENNYIKIFCH 687
946 SSHIDLEVSKIIYSVTRAFFKYLVCNIKDTIFGEEHYPOFFLSTLKHFIE 995
688 SDSI...LKFISAKOGGA...NMVE 706
996 IFSTKXYIFNRVC 1008
707 VI...KNFALQKIG 717

```

Figur 37

```

132 LSTOKOYFFQDEWNOVRAHIGNEL.FRHLYTKYLIFORTSE..CTLVOFC 178
1 HSRRO...KKPOAPIGNETNLDVLOMLEVYKSOIEHYKTQOOO 43
179 GNNVFDHLKVNOKFDKKQKGAADHNEPRCCSTCKYNNVKNEXDHFLNNIN 228
44 KEEDLXLKFKNOOOGNSCHNDOOEE.....MNSNKQOELLRRVN 84
229 VPMWNNMXSRTRIFYCTHFNRRNQFFKKHEFVSNKNNISAHDRQTIFTN 278
85 .....QIKQOVOLIKK...VGSKVEKDLNLDENKKN 114
279 IFRFNRIKXLKOKVIEKIAHLEKVKDFNFNYLTCKSCPLPENWRERKO 328
115 GLSEQOVKEEQLRITIEEQVKYONLVFMMDYQOLDLNEGCHRRHRRRETDY 164
329 KIENLINKTREESKYEEELFSYTTONKCVTOFINE.FFYNILPKOFLTC 377
165 DTEKMFESHQOK.....NYVSIYANQKTSYCWLKDYFNK 200
378 RNRIONFOKKVYVELNKHLEIHKNLLLEKINTREISWHQVETSAKHFY 427
201 MNYDHLNVSINRLE..TEAEFYAFDOFSOTIKLTNNSYOTVNID..... 242
428 FOHENIYVLWKLRLWI..FEDLVVSLIRCFYVTEQOKSYSKTYRKN 475
243 VNFDMNLCILALLRFLSLERFNILNIRSSY..TRNOYNFEKIGELLETI 290
476 WDVIMKHSIADLKKETLAEVQEKVEEWKSLGFAPGKLRLLIPKTTFRP 525
291 FAVVFSHR.....HLOGINLOVPCEAFQYLVNSSQISVKDSOLO 330
526 INTFNKKIVMSDRKTTKLTNTKLLNSHLHLKTLKNRMFKDPFGFAVFNY 575
331 VYSFSTOLXLD..TNKVQDYFKFLOEFPRLTHVSQQAIPVSATNAVENL 378
576 DDVHKXYEEFVCKWKQVQCPKLF.....FATHDIEKCYDS..VNRK 615
379 NVLLKXVKH..ANLNLVSIPTQNFDFYFVNLOHLKLEFGLEPNILTKOK 426
616 LSTFL.....RTTKLLSSDFWIMTAQILKRNKI..VIDSKNFRKKEHK 657
427 LENLLLSIKOSKNLKLRLNFIYTYVAQETSRKQILKQATTIKNLKNKNO 476
558 OYFRONFONALECCOYPTLFSVLEN..EQDOLNAKKT LIVEAKORNYFK 705
477 EETPETKDETPESTSGHFFDHLSELTELEDFSVN...LOATOELY 520
706 KDNELQPVINICQNYINFMCKFYKOTKCIPOGLCVSSILSSFYATLEE 755
521 OSILKLLIRSTNLKKFKLSYKHEKSKHDTFIDKNI.....YETLMN 564
756 SSLGFLRDESHNPNMNNLLHRLTDOYLLITTOENNAVLFIKLINVS 305
565 ..LKRCSTWISNPHCHISYELTN.....KOSTFYKFKLTLOE 500
806 ENGFKFMKKLOTSFPLSPSKFAKYCHOSVEEQNIVQDYCDWIGISIDMK 855
501 LOHAXYTFX..ONEFOFNNVKSAKIESSSLESLEDIDSLCKSIASCKNLO 648
856 TLALHPNINLRIGILCTLNLNHOT..KKASHWLKK..KLKSLFNWNT 901
549 NVNI.....EASLLYPNNIOKNPFKNPULLFFKQFEOLKNLNVSINC 691
902 YFAKTI..TTEDFANKTLNKLFISSGKYHQCAKEYKDHFKKNLAHSSH 948
692 ILDOHILNSISEFLEKNKKIKAFILKRYLLLOYLDYTKLFTLOQLPEL 741
949 IDLEYSKIIYSVT.....RAFFKYLVCNIKOT..IFGEEHY 982
742 NQVYINQOLEELTVSEVHKQVWENHKQAFYEPLCEFIKESOTLOLIDF 791
983 POFELS..TLNFIIEFSTKRY..IFNRVCHILKAKEARKLSDOCOSLIO 1028
792 DONTVSODSIXNILESISESKYHMYLRLNPSOSSSLIKSENEEIOELLK 840

```

Figur 38

```

4  OIOLDOIENLLPNTFNKYSSSCSDKKCKTKLSCSKSPSLTIPK..... 47
   ..|| ..|| ..|| ..|| ..|| ..|| ..|| ..|| ..|| ..||
617 NVKSAKIESSSLESLEDIDSLCKSIASCYNLONVNIASLLYPNNIOKNP 666
   ..|| ..|| ..|| ..|| ..|| ..|| ..|| ..|| ..|| ..||
48  LQKOLEFYFSDANLYNDSFLRKLVLKSCEORVE....IETLLK 86
   ..|| ..|| ..|| ..|| ..|| ..|| ..|| ..|| ..|| ..||
667 FNKPNLLFFKQFEQKNLENVSINCILDOHILNSISEFLEKNKKIKAFIL 715

```



Figur 39

```

1  MEMDIDLODIENL...LPNTFNKYSSSCSDKKCKTLKSGSKSPS... 42
   : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
491 TELAIKIAVNKNLDEIKCHTAIFSDVSCSHSTSHSGCAKXYCSVRTCLEC 540
   : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
43  LTIPKLOKO      LEFYFSDANLYNDSFLRKLVLKSGEORVEIETLL 85
   : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
541 ALVLGLHVKORCEKSSFYIFSSPSSOCNKCYL.EVDLPCDELRP SHQKLL 589

```

Figur 40

	MOTIV A	MOTIV B
"Consensus"	h--hDh---h--h	h----hQp---Sp
Telomerase p 123	QPKLFPATMCI EKCYDSVNREKLS TFLKMTKL L-100-KFYRQTKGIFQGLCVSSILSSFFYYATL EESSLGPL	
Dong (LINE)	KNRNLHCTYIDYKKA FDSIPHSVLIOVLEIYKIN-28-RQLAIKXGIYQGDLSLSPWFCCLALNPLSHQLHNDR	
al S.c.(Gruppe II)	FGGSNWFREVDLKRCFDTISHDLIIKELRYISD-26-HVPVGP RVCVCCAPTSPALCNVAVLRLRRLAGLA	
HIV-RT	LKKCKSVTVLDVGDAYFSVPLDEDFRYTAFTIP-7-SIRYQVNVLRCCWKGSIPAIFQSSMTKILFPFRKQN	
L854).12 YP4.14	VLPELYPMKFLVXKSCYDSIPRMECMRILKDALKN-68-KCYIREDEGLFQESSLSA?IVDLVYDDLLLEFYSEPK	

	MOTIV C	MOTIV D	MOTIV B
"Consensus"	h--YhDDhhhh	Ch-h---R	h-hCh-h
Telomerase p 123	-14-LMRLTDDYLLITTOENN-0-AVLFIERLLINVSRENCFKFNTRRLQOT-23-QDYCDWIGIS I		
Dong (LINE)	-16-HLIYMDI IKLYAKNDKE-0-MKKLIDTTTIFSNDISMQPGLDRCKT-25-KCJYKYLGFQO		
al S.c.(Gruppe II)	-55-YVRYADDIILIGVLGSKN-2-KI IKRDLN NFLNS.IGLTINEERTLI-4-ET?ARFLGNYI		
HIV-RT	-4-IYQYMDL YVGS HLEIG-1-HRTKIEELRQHLLRWGLTTPDRHQK-0-EP?FLMWGYEL		
L854).12 YP4.14	-8-ILKLADDFLIISTDQOQ...VINIKKLAMCQPKYNARNNR-41-IRSKSSKGI FR		

Figur 41

Telomerase p43  
 humanes La  
 Xenopus LaA  
 Drosophila La  
 S. c. Lhplp

LQKQLEFYVSDANLYNDSFIRKLVLKSGEQRVEIETLLM  
 ICHQDEYVFGDENLPRDKELKEQI.KLDEGWVPLEIMIK  
 ICEQDEYVFGDENLPRDKELKQOI.LLDDGWVPLETMIK  
 ILRQVEYVFGDANLNROKELREQIGKNEDGWVPLSVLVT  
 CLKQMEFYVSEFNFPYDRELRTTAEK.NDGWVPISTIAT

Figur 42

1 aactcatta attactaan taatcaacaa gattgataaa aagcagtaaa taaaacccaa  
 61 tagatttaa: tagaaagta tcaattgaaa aatggaaaat gaaaacaact aagcacata  
 121 gccaaagcc gaaaaatgt ggtgggaact tgaattagag atgcaagaaa accaaaatga  
 181 tatataagt agggtaaga ttgacgatcc taagcaatat ctctggaacg tcactgcagc  
 241 atgtttgtg taggaaggta gttactacta agataaagat gaaagaagat atatcatcac  
 301 taaagcacti ctgagggtgg ctgagttga tctgagttc atctgctagt tggcagttc  
 361 catccgtaat gaacttaca tcagaactac cactaactac atttagcat tttgttgt  
 421 ccacaagaat actcaacct tcatgaaaa gtacttcaac aaagcagtac ttgtccaa  
 481 tgacttacg gaagtcgtg aattgcata ggttctctat amttgatg caactgaat  
 541 caaaaattg tatctgata ggatacttc ataagatat cgtgaaggac tcaattccg  
 601 taagtgtta caaagatgag tcagaagcaa gttttcgtgaa tcaacgaat actaactgg  
 661 taagtattgc actgaacct aacgtaagaa aacaattgtc cgttacctct cagtaccaa  
 721 caagtaaaag tggattaaa ctaagaagaa gagaaaagag aatctctaa ccaaaactta  
 781 ggcaataaag gaatctgaag ataagtcaa gagagaaact ggagacataa tgaacgtga  
 841 agatgcaatc aaggcttaa aaccagcagt tatgaagaaa atagccaaga gatagaatgc  
 901 catgaagaaa cacatgaagg cactaaaaat tcttaactct acctgggaat caaagtact  
 961 gacctcaag gatctcatta agttctgcca tattctgag cctaaagaaa gagtctata  
 1021 gatccnngt aaaaaatacc ctaagaccga agaggaatc aaagcagcti ttgtgattc  
 1081 tgcactgca ccttcaatc ctgaattggc tggaaagcgt atgaagattg aaatctctaa  
 1141 aacatgggaa aatgaactca gtgcaaaagg caacactgct gaggtttggg ataattaat  
 1201 tcaagcaat taactccat atatggccat gttacgtaac ttgtctaa ca tctaaaagc  
 1261 cgggtgtca gatactacac actctattgt gatcaacaag atttgtgagc ccaaggccgt  
 1321 tgagaactcc aagatgttcc ctctcaatt cttagtgcc attgaagctg ttaatgaagc  
 1381 agttactaag ggattcaagg ccaagaagag agaaaatatg aatctaaag gtcaaatcga  
 1441 agcagtaaaag gaagttgtg aaaaaaccga tgaagagaag aaagatatgg agttggagta  
 1501 aaccgaagaa ggagaattg taaagtcaa cgaagggaat ggcaagcaat acattaacic  
 1561 cattgaacti gcaatcaaga tagcagttaa caagaattta gatgaaatca aaggacacac  
 1621 tgcacttnc tctgatgtt ctggttctat gattacctca atgtcagggt gagccaagaa  
 1681 gtatggnc gttctacti gttctgagtg tgcattagtc ctgggttga tggtaaaata  
 1741 acgtgtgaa aagttccat tctacatct cagttacct agttcaat gcaataagtg  
 1801 tacttaaga gttatctcc ctggagacga actccgtctt tctatgtaa aactttgca  
 1861 agagaagga aaactgggtg tgggtactga ttccctat gattgcatg atgaatggac  
 1921 aaagaataaa actcacgtag acaatatct tattgtcti gatatgatga ttgagaagg  
 1981 atattcagat atcaatgta gaggcagttc catgttaac agcatcaaaa agtacaagga  
 2041 tgaagtaaat cctaactta aaactttgc agttgacta gaaggttacg gaaagtgcct  
 2101 taatctaggt gatgattca atgaaaacaa ctacatcaag atattcggt tgaagcattc  
 2161 aatctaaag ttacttcag ccaagcaagg aggagcaaat atggtcgaag ttatcaaaa  
 2221 ctgtccctt caaaaaatag gacaaaagtg agttcttga gattctcta taacaaaaa  
 2281 ctacccccc ttttgtt tattgcatag cttatgaa attaaatta ttatattt  
 2341 attaaagta ctacatagt tatgtatc cagtctatta gcctattcaa atgattctg  
 2401 aaagaacaaa aaagattaaa a

Figur 43

MEIENNQAQQPKAEKLWWELELEMQENQNDIQVRVKIDDPKQYL  
VNVTAACLLQEGSYQDKDERRYIITKALLEVAESDPEFICQLAVYIRNELYIRTTTN  
YIVAFCVVHKNTQPFIEKYFNKAVLLPNDLLEVCEFAQVLYIFDATEFKNLYLDRILS  
QDIRKELTFRKCLQRCVRSKFSEFNEYQLGKYCTESQRKKTMFYLSVTNKQKWDQTK  
KKRKENLLTKLQAIKESDKSKRETGDIMNVEDAIKALKPAVMKKIAKRQNAMKKHMK  
APKIPNSTLESKYLTFKDLIKFCHSEPKERVYKJLGKKYPKTEEEYKAAFSDSASAP  
FNPELAGKRMKIE!SKTWENELSAKGNTAEVWDNLISSNQLPYMAMLRNLSNTLKAGV  
SDTTHSIVTNKICEPKAVENSKMFPLQFFSAIEAVNEAVTKGFKAKKRENMNKKGQIE  
AVKEVVEKTDEEKKDMELEQTEEGEFVKVNEGIGKQYINSIELAIKIAVNKNLDEIKG  
HTAIFSDVSGSMSTSMSSGAKKYGSVRTCLECALVLGLMVKQRCEKSSFYIFSSPSSQ  
CNKCYLEVLDLPGDEL RPSMQKLLQEKGLGGGTDFPYECIDEWTKNKTHVDNIVILSD  
MMIAEGYSDINVRGSSIVNSIKKYKDEVNPNIKJFAVDLEGYKCLNLGDEFNENNYI  
KJFGMSDSILKFISAKQGGANMVEVIKNFALQKJGQK

Figur 44

1 tcaatactat taattaataa ataaaaaaaa gcaaaactaca aagaaaatgt caaggcgtaa  
 61 ctaaaaaag ccataggctc ctataggcaa tgaacaaat ctgattttg tattacaaza  
 121 tctagaagt tacaaaagcc agattgagca taaagacc tagtagaat agatcaaga  
 181 ggaggatctc aagctttaa agtcaaaaa taagattag gatggaaact ctggcaacga  
 241 tgatgatgat gaagaaaaca actcaataa ataataagaa taataagga gattcaatta  
 301 gattaagtag caagttaat tgataaaaa agttggttct aaggtagaga aagattgaa  
 361 ttgaacgaa gatgaaaaca aaaagaatgg acmtctgaa tagcaagtga aagaagagta  
 421 attaagaacg attactgaag aataggttaa gtattaaaat tagtattta acatggacta  
 481 ccagttgat taaatgaga gtgggggcca tagaagacac agaagagaaa cagattatga  
 541 tactgaaaa tggttgaaa tctctatga ccaaaaaat tatgtatcaa ttacgccaa  
 601 ctaaaagaca tcatattgt gggtggctaa agatttttt aataaaaaa attatgatca  
 661 tctaatgta agcatcaaca gactagaac tgaagccgaa tctatgcct ttgatgatt  
 721 ttcaaaaa atcaaaccta ctaataatc ttactagact gtaacatag acgttaatt  
 781 tgataataat ctctgtatc tgcattgct tagattttta ttactactag aaagattcaa  
 841 tatttgaat ataagattt ctatacaag aataaataa aatttgaga aatttggtga  
 901 gctactgaa actatcttg cagttgttt tctcatgc cactacaag gcatcatt  
 961 acaagttct tgcgaagcgt tctaatttt agttaactcc tcatcataa ttgctgtaa  
 1021 agatagctaa ttataggta actctctc tacagactta aaattagttg acactaaca  
 1081 agtccaagat tatttaagt tctataaga attcctctg ttgactcatg taagctagta  
 1141 ggctatccca gttagtcta ctacgcctg agagaacctt aatgtttac taaaagggt  
 1201 caagcatgct aatctaat tagttctat cctaccta ttcaatttg attctact  
 1261 ttttaatta taacattga aattagatt ttgattagaa ccaaatatt tgacaaaaca  
 1321 aaagctgaa aatctact ttgattataa ataataaaa aatcttaaat ttttaagatt  
 1381 aaactttac acctacgtt ctaagaac ctcagaaaa cagatattaa acaagctac  
 1441 aacaatcaa aatctcaaa acaataaaa tcaagaagaa actcctgaaa ctaaagatga  
 1501 aactccaagc gaaagcaca gtggtatgaa attttgat catctctg aattaacga  
 1561 gctgaagat ttacgcgta acttgtaagc tacccaagaa attatgata gcttgcaaa  
 1621 actttgat agatcaaca attaaagaa gtcaaaata agttcaaat atgaaatgga  
 1681 aaagagttaa atggatcat tcatagatct taagaattt tatgaaacct taaacaatct  
 1741 taaaagatgc tctgtaata tatcaaatcc tatggaaac attcttatg aactgacaaa  
 1801 taaagattct actttata aatttaagct gacctaaac taagaattat aacacgctaa  
 1861 gtatcttt aagtagaac aatttaatt taataacgtt aaaagtgc aaattgaatc  
 1921 ttctctta gaaagctag aagatattga tagtcttg aaatctatg ctctgtaa  
 1981 aaattcaa aatgttaata ttatgccag ttgtctat cccaacaata ttgaaaaa  
 2041 tctmcaat aagcccaat tctatttt caagcaatt gaataattga aaatttga  
 2101 aaatgtatct atcaactgta ttctgata gcatatact aattctatt cagaattct  
 2161 agaaaagaat aaaaaataa aagcattat ttgaaaaga tattattat tacaattat  
 2221 tctgattat actaaattat taaaacact tcaatagta cctgaattaa attagttta  
 2281 catnaattag caatagaag aattgactgt gagtgaagta cataagtaag tatgggaaa  
 2341 ccacaagcaa aaagcttct atgaaccatt atgtgagtt atcaaagaat catcttaac  
 2401 ccttagcta atagatttg accaaaacac tgaagtgat gactctatta aaagatttt  
 2461 agaattctata tctgagtcta agtatcata ttattgaga ttgaacctta gttatctag  
 2521 cagtttaatt aaatctgaaa acgaagaat ttaagaact ctcaaagctt gcgacgaaa  
 2581 aggtgttta gtaaaagcat actataaatt cctctatgt ttaccaactg gtactatta  
 2641 cgattacaat tcatagatgt ggtgattaat taaattatag ttazataaa tattaaatat  
 2701 tgaatattc ttgttaatt attgaataa tacaataat agtcatttt agtggttga  
 2761 atattttta gttattat tcatattt aagtaataa ttatttca atcatttt  
 2821 aaaaaatcg

Figur 45

MSRRNQKKPQAPIGNETNLDVFLQNLEVYKSQIEHYKTQQQIK  
 EEDLKLLKFKNQDQDGNNGDDDEENNSNKQQELLRRVNQIKQQVQLIKKVGSKVEK  
 DLNLNEDENKKNGLSEQQVKEEQLRITITEEQVKYQNLVFNMDYQLDLNESGGHRRHRF  
 .ETDYDTEKWFEISHDQKNYVSIYANQKTSYCWWLKDYFNKNNDHLNVSNRLETEAE  
 FYAFDDFSQTIKLTNNSYQTVNIDVNFNNLCILALLRFLSLERFNILNIRSSYTRN  
 QYNFEKIGELLETFVVFSHRHLQGIHLQVPCEAFQYLVNSSSQISVKDSQLQVYSF  
 STDKLVDTNKVQDYFKFLQEFPRLTHVSQQAIPVSATNAVENLNVLLKKVKHANLNL  
 VSIPTQFNFDYFVNLQHLKLEFGLEPNILTKQKLENLLLSIKQSKNLKFLRLNFYTY  
 VAQETSRKQILKQATTIKNLKNNKNQEETPETKDETPSESTSGMKFFDHLSELTELED  
 FSVNLQATQEIYDSLHKLLIRSTNLKKFKLSYKYEMEKSKMDTFIDLKNYETLNNLK  
 RCSVNISNPHGNISYELTNKDSTFYKFKLTNLQELQHAKYTFKQNEFQFNNVKSAKIE  
 SSSLESLEDIDSLCKSIASCKNLQNVNIIASLLYPNNIQKNPFNKPNLLFFKQFEQLK  
 NLENVSINCILDQHILNSISEFLEKNKKIKAFILKRYLLQYYLDYTKLFKTLQQLPE  
 LNQVYINQQLEELTVSEVHKQVWENHKQKAFYEPLCEFIKESSQTLQLIDFDQNTVSD  
 OSIKKILESISESKYHHYLRLNPSQSSSLIKSENEEIQELLKACDEKGVLVKAYYKFP  
 LCLPTGTYYDYN'SDRW

Figur 46

MKILFEFIQDKLDIDLQTNSTYKENLKCGHFNGLDEILTTCFAL  
PNSRKIALPCLPGDLSHKAVIDHCIIYLLTGELYNNVLTFGYKIARNEDVNNSLFCHS  
ANVNVTLKGAAWKMFHSLVGTYAFVDLLINYTVIQFNGQFFTQIVGNRCNEPHLPPK  
WVQRSSSSSATAAQIKQLTEPVTNKQFLHKLNNSSSFFPYSKILPSSSSIKKLTDLR  
EAIFPTNLVKIPQRLKVRJNLTLQKLLKRHKRLNYVSILNSICPPLEGTVLDLSHLSR  
QSPKERVLFIIIVILQKLLPQEMFGSKKNKGKIIKNLNLNLLSLPLNGYLPFDSLLKKL  
RLKDFRWLFISDIWFTKHNFNENLNQLAICFISWLFRLIPKIIQTFYCTEISSTVTI  
VYFRHDTWNKLITPFIVEYFKTYLVENNVCRNHNSYTLSNFNHSMRIIPKKSNNEFR  
IIAIPCRGADDEEFTIYKENHKNAIQPTQKILEYLRNKRPTSFTKIYSPTQIADRIKE  
FKQRLKKFNNVLPELYFMKFQDVKSCYDSIPRMECMRILKDALKNENGFFVRSQYFFN  
TNTGVLKLFNVVNASRVPKPYELYIDNVRTVHLSNQDVINVVEMEIKTALWVEDKCY  
IREDGLFQGSSLSAPIVDLVYDDLLEFYSEFKASPSQDTLILKLADDFLIISTDQQQV  
INIKKLAMGGFQKYNAPANRDKJLAVSSQSDDDTVIQFCAMHIFVKELEVWKHSSTMN  
NFHRSKSSKGIFRSLIALFNTRISYKTIDTNLNSTNTVLMQIDHVVKNISECYKSAF  
KDLSNVTQNMQFHSFLQRIEMTVSGCPITKCDPLIEYEVRFILNGFLESLSNNTS  
KFKDNIILLRKEIQHLQAYIYIYIHIVN



Figur 47

<i>Oxytricha</i>	LCVSYILSSFYYANLEENALQFLRKESMDPEKPETNLLMRLT
<i>Euplotes</i>	LCVSSILSSFYYATLEESSLGFLRDESMNPENPNVNLLMRLT

Figur 48

ATTTATACTCATGAAAATCTTATTTCGAGTTCATTCAAGACAAGCTTGACATTGATCTACA  
GACCAACAGTACTTACAAAGAAAATTTAAAATGTGGTCACTTCAATGGCCTCGATGAAAT  
TCTAACTACGTGTTTCGCACTACCAAATTCAGAAAAATAGCATTACCATGCCTTCCTGG  
TGACTTAAGCCACAAAGCAGTCATTGATCACTGCATCATTTACCTGTTGACGGGCGAATT  
ATACAACAACGTACTAACATTTGGCTATAAAAATAGCTAGAAATGAAGATGTCAACAATAG  
TCTTTTTTGGCATTCTGCAAATGTTAACGTTACGTTACTGAAAGGCGCTGCTTGAAAAAT  
GTTCCACAGTTTGGTGGTACATACGCATTGCTTGATTTATTGATCAATTATACAGTAAT  
TCAATTTAATGGGCAGTTTTTCACTCAAATCGTGGGTAAACAGATGTAACGAACCTCATCT  
GCCGCCCAAATGGGTCCAACGATCATCCTCATCATCCGCAACTGCTGCGCAAATCAAACA  
ACTTACAGAACCAGTGACAAATAAACAATTCTTACACAAGCTCAATATAAATTCCTCTTC  
TTTTTTTCTTATAGCAAGATCCTTCCTTCATCATCATC CATCAAAAAGCTAACTGACTT  
GAGAGAAGCTATTTTTCCCACAAATTTGGTTAAAATTCCTCAGAGACTAAAGGTACGAAT  
TAATTTGACGCTGCAAAAGCTATTAAAGAGACATAAGCGTTTGAATTACGTTTCTATTTT  
GAATAGTATTTGCCCACCATTGGAAGGGACCGTATTGGACTTGTCGCATTTGAGTAGGCA  
ATCACCAAAGGAACGAGTCTTGAAATTTATCATTGTTATTTTACAGAAGTTATTACCCCA  
AGAAATGTTTGGCTCAAAGAAAAATAAAGGAAAAATTATCAAGAATCTAAATCTTTTATT  
AAGTTTACCCTTAAATGGCTATTTACCATTTGATAGTTTGTGAAAAAGTTAAGATTAA  
GGATTTTCGGTGGTTGTTTCAATTTCTGATATTTGGTTTACCAAGCACAAATTTGAAAACTT  
GAATCAATTGGCGATTTGTTTCAATTTCTGGCTATTTAGACAATAATTCCCAAAATTTAT  
ACAGACTTTTTTTTTACTGCACCGAAATATCTTCTACAGTGACAATTGTTTACTTTAGACA  
TGATACTTGGAAATAAACTTATCACCCCTTTTATCGTAGAATATTTTAAAGACGTACTTAGT  
CGAAAACAACGTATGTAGAAACCATAATAGTTACACGTTGTCCAATTTCAATCATAGCAA  
AATGAGGATTATACCAAAAAAAGTAATAATAGAGTTCAGGATTATTGCCATCCCATGCAG  
AGGGGCAGACGAAGAAGAATTCACAATTTATAAGGAGAATCACAAAAATGCTATCCAGCC  
CACTCAAAAAATTTTAGAATACCTAAGAAACAAAAGGCCGACTAGTTTTACTAAATATA  
TTCTCCAACGCAATAGCTGACCGTATCAAAGAATTTAAGCAGAGACTTTTAAAGAAATT  
TAATAATGTCTTACCAGAGCTTTATTTTATGAAATTTGATGTCAAATCTTGCTATGATTC  
CATACCAAGGATGGAATGTATGAGGATACTCAAGGATGCGCTAAAAAATGAAAATGGGTT  
TTTCGTTAGATCTCAATATTTCTTCAATACCAATACAGGTGTATTGAAGTTATTTAATGT  
TGTTAACGCTAGCAGAGTACCAAAACCTTATGAGCTATACATAGATAATGTGAGGACGGT  
TCATTTATCAAATCAGGATGTTATAAACGTTGTAGAGATGGAAATATTTAAACAGCTTT  
GTGGGTTGAAGATAAGTGCTACATTAGAGAAGATGGTCTTTTTTCAGGGCTCTAGTTTATC  
TGCTCCGATCGTTGATTTGGTGTATGACGATCTTCTGGAGTTTTATAGCGAGTTTAAAGC  
CAGTCCTAGCCAGGACACATTAATTTTAAACTGGCTGACGATTTCTTATAATATCAAC  
AGACCAACAGCAAGTGATCAATATCAAAAAGCTTGCCATGGGCGGATTTCAAAAATATAA  
TGCGAAAGCCAATAGAGACAAAATTTAGCCGTAAGCTCCCAATCAGATGATGATACGGT  
TATTCAATTTTGTGCAATGCACATATTTGTTAAAGAATTGGAAGTTTGGAACATTCAAG  
CACAAATGAATAATTTCCATATCCGTTGAAATCTAGTAAAGGGATATTTGGAAGTTTAAAT  
AGCGCTGTTTAACTAGAAATCTCTTATAAAACAATTGACACAAATTTAAATTCAACAAA  
CACCGTTCTCATGCAAATTGATCATGTTGTAAAGAACATTTGGAATGTTATAAATCTGC  
TTTTAAGGATCTATCAATTAATGTTACGCAAAATATGCAATTTCAATCGTTCTTACAACG  
CATCATTGAAATGACAGTCAGCGGTTGTCCAATTACGAAATGTGATCCTTTAATCGAGTA  
TGAGGTACGATTCACCATATTGAATGGATTTTGGAAAGCCTATCTTCAAACACATCAAA  
ATTTAAAGATAATATCATTCTTTTGAGAAAGGAAATTCAACACTTGCAAGC

Figur 49

AKFLHWLMSVYVVELLRSFFYVTETTFQKNRLFFYRKS VWSKLQSIGIRQHLKR  
VQLRDVSEAEVRQHREAR PALLTSRLRFIPKPDGLRPIVNMDYVVGARTFRREKR  
AERLTSRVKALFSVLNYERA

Figur 50

GCCAAGTTCCTGCACTGGCTGATGAGTGTGTACGTCGTCGAGCTGCTCAGGTC  
TTTCTTTTATGTCACGGAGACCACGTTTCAAAGAACAGGCTCTTTTTCTACC  
GGAAGAGTGTCTGGAGCAAGTTGCAAAGCATTGGAATCAGACAGCACTTGAA  
GAGGGTGCAGCTGCGGGACGTGTCGGAAGCAGAGGTCAGGCAGCATCGGGA  
AGCCAGGCCCCGCCCTGCTGACGTCCAGACTCCGCTTCATCCCCAAGCCTGACG  
GGCTGCGGCCGATTGTGAACATGGACTACGTGTCGTCGGGAGCCAGAACGTTCCG  
CAGAGAAAAGAGGGCCGAGCGTCTCACCTCGAGGGTGAAGGCACTGTTTCAGC  
GTGCTCAACTACGAGCGGGCGCG

Figur 51

MTEHHTPKSRJLRFLFNQYVYLCTLNDYVQLVLRGSPASSYSNICERLRSDVQTSFSIFLHSTVVGF  
DSKPDEGVQFSSPKCSQSELIANVVKQMFDESFERRRNLLMKGFSMNHEDFRAMHVNGVQNDLV  
STFPNYLISILESKNWQLLEIIGSDAMHYLLSKGSIFEALPNDNYLQISGIPLFKNNVFEETVSKKRK  
RTIETSITQNK SARKEVSWNSISIRFSIFYRSSYKFKQDLYFNLHSICDRNTVHMWLQWIFPRQFG  
LNAFQVKQLHKVIPLVSQSTVVPKRLLKVYPLIEQTAKRLHRJLSKVYNHYCPYIDTHDDEKILS  
YSLKPNQVFAFLRSILVRVFPKLIWGNQRIFEIILKDLETFLKLSRYESFSLHYLMSNIKISEIEWLVL  
GKRSNAKMCLSDFEKRKQIFAEFIYWL YNSFIIPILQSFFYITESSDLRNRTVYFRKDIWKLLCRPFIT  
SMKMEAF EKINENNVRMDTQKTTLP PAVIRLLPKKNTFRLITNLRKRFLIKMGSNKKMLVSTNQT  
LRPVASILKHLNEESSGIPFNLEVYMKLLTFKKDLLKHRMFGRKKYFVRIDIKSCYDRIKQDLMFR  
IVKKKLLKDPEFVIRKYATIHATSDRATKNFVSEAFSYFDMVPFEKVVQLLSMKTSDTLFVDFVDY  
WTKSSSEIFKMLKEHLSGHIVKIGNSQYLQKVGIPQGSILSSFLCHFYMEDLIDEYLSFTKKKGSVL  
LRVVDDFLFITVNKKDAKKFLNLSLRGF EKFNFTSLEKTVINFENSNGIINNTFFNESKKRMPFFG  
FSVNMRLD TLLACPKIDEALFNSTSVELTKHMGKSFFYKILRSSLASFAQVFIDITHNSKFNSCCN  
YRLGYSMCMRAQAYLKRMKDIFIPQRMFITDLLNVIGRKIWKKLAEILGYTSRRFLSSAEVKWLFC  
LGMRDGLKPSFKYHPCFEQLIYQFQSLTDLIKPLRPVLRQVFLHRRJAD

ggtaaccgattacmccmccnataagctaattgcnccctgaacgcctccaaatctctggaaatamttacaagaacccaataaaca:3ccaagicaaattccaatagaagg  
 tgnattagigalcgataaiaamctamtaicggicgntaccaagtaataaggacaaaagaacaacnccnccccctaaagacmmtamtaamttacmmtcaaatatamcg  
 ggncgcttactmmtaalcigggiactgnttagcigctactnctagccaacccgctgntctaccccgicantggatataagcicntggagtagctcacagaatccttacaacn  
 cigaigagactatannagancatnacagiccgcgcatattcctaacatggagccntacacmmtagatgagtcacgicgcatgagggatmgtatcatccaacgntgccttg  
 aaaaagntgataaamcgcaaaatcagtcctnagtggtggtaacccggaagntmgtalgcntgcacacgicctagcatgagtagatncaaaaamttctccactacaa  
 ciccmtaacgcggmtamttctamttctatnctcatgntgntccaaatagatcatcctcgtaaggcmtmccgntactcctggaaicgtaacmmtcactatccccctaatg  
 aataaictaaantagmccgntaataatgataagtagtagaagaagntggtagntactcctgtaagntamtagmnaagatacmtgcaaaacattattagctatcattataaaa  
 aaaaicctataaantataaataaatacaalamtgccgicactamttamtaaaacgntaigatcagtaggacacmgtacataatataatagntaigcnaatggtaactnctaactgcAT  
 GACCGAACACCATACCCCCAAAAGCAGGATTCTTCGCTTTCTAGAGAATCAATATGTATACCTATGTAT  
 CCTTAAATGATTATGTACAACCTTGTGAGAGGGTGCGCCGCAAGCTCGTATAGCAATATATGCGAA  
 CGCTTGAGAAGCGATGTACAACCGTCCCTTTTCTATTTTCTTCATTCTGACTGTAGTCGGCTTCGACAGT  
 AAGCCAGATGAAGGTGTTCAATTTTCTTCTCCAAAATGCTCACAGTCAGAGgtatataamttmgtmgtmmtctantcg  
 ggatagcnaatataatggcagCTAATAGCGAATGTTGTAAAACAGATGTTTCGATGAAAGTTTTGAGCGTCGAAGGA  
 ATCTACTGATGAAAGGGTTTTCCATGgtaaagntactaantgtaaatamacctgcaantactgntcaaaagagantamtaaccgntaaagAA  
 TCATGAAGATTTTCGAGCCATGCATGTAAACGGAGTACAAAATGATCTCGTTTTCTACTTTTTCTTAATTA  
 CCTTATATCTATACTTGAGTCAAAAAATTGGCAACTTTTTGTTAGAAATgtaaataaccgntaagatgntgcgcactmgaaca  
 agactgacaagtagTATCGGCAGTGATGCCATGCATTACTTATTATCCAAAGGAAGTATTTTTGAGGCTCTTC  
 CAAATGACAATTACCTTCAGATTTCTGGCATACCACTTTTTAAAAATAATGTGTTTGAGGAAACTGTGT  
 CAAAAAAAAGAAAGCGAACCATTGAAACATCCATTACTCAAAAATAAAAGCGCCCCGAAAGAAAGTTTC  
 CTGGAATAGCATTTCAATTAGTAGGTTTAGCATTTTTTACAGGTCATCCTATAAGAAGTTTAAGCAAGgt  
 aactaatactgntactcctcataactaamtagATCTATATTTTAACTTACACTCTATTTGTGATCGGAACACAGTACACATG  
 TGGCTTCAATGGATTTTTCCAAGGCAATTTGGACTTATAAACGCATTTCAAGTGAAGCAATTCACAA  
 AGTGATTCCACTGGTATCACAGAGTACAGTTGTGCCCAAACGTCCTAAAGGTATACCTTTAATTGA  
 ACAACAGCAAAGCGACTCCATCGTATTTCTCTATCAAAAGTTTACAACCATTATTGCCCATATATTGA  
 CACCCACGATGATGAAAAATCCTTAGTTATTCTTAAAGCCGAACCAGGTGTTTGCCTTTCTTCGATC  
 CATTCTTGTTTCGAGTGTTTCTTAAATTAATCTGGGGTAACCAAAGGATATTTGAGATAATATTAAGGg  
 tatgtataaaamttaccactaacgattaccagACCTCGAACTTTCTTGAAATTATCGAGATACGAGTCTTTTAGTTTAC  
 ATTAATTTAATGAGTAACATAAAGgtataatgccaamtttaccattaaatacaatcagATTTTCAGAAATTGAATGGCTAGT  
 CCTTGGAAAAAGGTCAAATGCGAAAATGTGCTTAAGTGATTTTGAGAAACGCAAGCAAAATATTTGCGG  
 AATTCATCTACTGGCTATACAATTCGTTTATAATACCTATTTTACAATCTTTTTTTATATCACTGAATC  
 AAGTGATTTACGAAATCGAAGTGTATTTTTAGAAAAGATATTTGGAAACTCTTGTCGCCGACCTTTAT  
 TACATCAATGAAAAATGGAAGCGTTTGAAAAATAAACGAGgtantaaagantmgtgcaaaagcnaatamtcagAACAA  
 TGTTAGGATGGATACTCAGAAAACTACTTTGCCTCCAGCAGTTATTCGTCTATTACCTAAGAAGAATAC  
 CTTTCGTCTCATTACGAATTTAAGAAAAAGATTCTTAATAAAAGgtantaamttggicacatgactmactnctaatctanttag  
 cagATGGGTTCAAACAAAAAAATGTTAGTCAGTACGAACCAAACTTTACGACCTGTGGCATCGATACTG  
 AAACATTTAATCAATGAAGAAAGTAGTGGTATTCATTTAACTTGGAGGTTTACATGAAGCTTCTTACT  
 TTTAAGAAGGATCTTCTTAAGCACCGAATGTTTGGgtataataatgcccgaattcctcattantaamtcagCGGTAAGAAG  
 TATTTTGTACGGATAGATATAAAATCCTGTTATGATCGAATAAAGCAAGATTTGATGTTTCGGATTGTT  
 AAAAAAGAACTCAAGGATCCCGAATTTGTAATTCGAAAGTATGCAACCATACATGCAACAAGTGACCG  
 AGCTACAAAAAATTTGTTAGTGAGGCGTTTTCTTATTglaagmtamttcattggaamttmaacaaatcmtmtagTTGATAT  
 GGTGCCTTTTGA AAAAGTCGTGCAGTTACTTTCTATGAAAACATCAGATACTTTGTTTGTGATTGTTGT  
 GGATTATTGGACCAAAAGTTCTTCTGAAATTTTTAAAATGCTCAAGGAACATCTCTCTGGACACATTGT  
 TAAGgtataaccaantgtaantgtaataacactaatgaacttagATAGGAAATTTCTCAATACCTTCAAAAAGTTGGTATCCCTC  
 AGGGCTCAATTCTGTATCTTTTTTGTGTCTTTCTATATGGAAGATTTGATTGATGAATACCTATCGTT  
 TACGAAAAAGAAAGGATCAGTGTTGTTACGAGTAGTCGACGATTTCTTTATAACAGTTAATAAAAA  
 AGGATGCAAAAAAATTTTTGAATTTATCTTTAAGAGgtagntgctgicantcctaagntctaaccgntgaagGATTTGAGAA  
 ACACAATTTTTCTACGAGCCTGGAGAAAACAGTAATAAACTTTGAAAATAGTAATGGGATAATAAACA  
 ATACTTTTTTAAATGAAAGCAAGAAAAGATGCCATTCTTCGGTTTCTCTGTGAACATGAGGTCTCTTG  
 ATACATTGTTAGCATGTCCTAAAATTTGATGAAGCCTTATTTAACTCTACATCTGTAGAGCTGACGAAAC  
 ATATGGGGAAATCTTTTTTTTCAAAAATTTCTAAGgtataactgigtaactgaataatagctgacaaataatcagATCGAGCCTTGC  
 ATCCTTTGCACAAGTATTTATTGACATTACCCACAATTCAAAATTCATTTCTTGCTGCAATATATATAG  
 GCTAGGATACTCTATGTGTATGAGAGCACAAGCATACTTAAAAAGGATGAAGGATATATTTATCCCC  
 AAAGAATGTTTCATAACGGgtgagtagntamtttaactagaaaagcattaaataaccnttagATCTTTTGAATGTTATTGGAAGAAAA  
 ATTTGGAAAAAGTTGGCCGAAATATTAGGATATACGAGTAGGCGTTTTCTTGCTCTGCGAGAAGTCAA

Figur 52 (Fortsetzung)

ATGgtacgtgtcgggtctcgagacitcagcaatattgacacatcagGCTTTTTTGTCTTGGAATGAGAGATGGTTTGAAACCCTCTT  
TCAAATATCATCCATGCTTCGAACAGCTAATATACCAATTTTCAGTCATTGACTGATCTTATCAAGCCGC  
TAAGACCAGTTTTGCGACAGGTGTTATTTTTACATAGAAGAATAGCTGATTAAitgicamccaamttatatacatccti  
tattactgggtcttaaaacaatatattactaagiatagctgaccccaaaagcaagcatactataggattctagtaaaagtaaaanaatctcgtatagtttgantgactgtctt  
atccnatactttaagaaagantgacagtggtgtgactactgcccacatgcccanaaacgggagtggntaaacattaaagtaatacatgaggctaattctcttcattag  
aataaggaaaagggtttctataatgaataatgcccgcactaatgcaaaaagacgaagantatctttaaacaagggggattagcataccgaaggaaaagagagtaatat  
accagtggtgtgaagaaagcaaggataatggacaagcttctgagatgacaggctaaatttgggtgaccgaatttggtaaaagcccagggtatccatgggtggccg  
gcttgcactgagacgaaaagaaactaaggatagttgaatactaatagctcattaatgtcttatataagggttttttccctgacttcaattgcatgggtgaaaagaaata  
gtgntaagccattatggatccgaaatagccaaattcttgggtccctcaaaagcgggaagtctaaagaactantgaagcttatgaggctcaaaaacccctctgattaaaggag  
gaatctccaccgatgaggaaatggatagctatcagctgtgaggagaagcctaattttgcaaaaagaaaataatcattgggagacatctctgtatgaatcagatgcgga  
gagtatctccagcggatccgtatgtcaataacnctamttctgaaatgtatgggtctactgtcgttcgacttctgtagctctacgcagtaagtgaccaaagggtacc

Figur 53

EST2 pep	FFVCTEISST VTIVYFRHDT WN----KLIT F-----FIVE YFK-TYLVEN	40
Euplotes pep	FFVATEQOKS YSKTYYYRKN IWDVI-MQMS IAD----LKK ETLA--EVQE	43
Trans von tetrahymen.	-----KHGE GSQIFYRKP IWKLVSCLTI VKVRIQFSEK NKQMKNFYQ	44
"Consensus"	FFV..TE..K. .S..YYRK. IW...-KL.. ----F..K .....V..	50
EST2 pep	NVCRNHNSY- ----- TLSNFNHSKM RITIPKSNNE RITIPCRG	79
Euplotes pep	KVEEHWKXSL ----- ---GFAPGKL RITIPKDTT-- FRHMTFNKK	78
Trans von tetrahymen.	KIQLEENLE KVEEKLIPED SFQKYPQCG RITIPKCS-- FRHMTFLRK	32
"Consensus"	K...E..... ----- ....F...GVL RITIPK... FRHMTF.RK	100
EST2 pep	ADEESTTIYK ENHQNAIQPD QKILEYRNK RPTSFTKIYS PTQLADRIKE	129
Euplotes pep	IVNSDRKTTK LTNTKLINS HLMLKTEKN- -----RMFK -DPFGFAVEN	120
Trans von tetrahymen.	DKQKNIK--- LNLNQILMDS QLVFRNED- -----ML-G -QKIGYSVED	130
"Consensus"	.....K..K LN.N..L..S QL.L..EKN- -----...IG..VF.	150
EST2 pep	FXORLLKKN NVL----- PELLFMKFD VKSCYD	157
Euplotes pep	YD-DVMSQYE EFVCKWKQVG QKTEFFATMD IEKCYD	155
Trans von tetrahymen.	NK-QISEKFA QFIEKWKNG RPTLYVTL- -----	158
"Consensus"	.K-...KGF. .F..KWK..G .E.LVF.T.D ...CYD	186

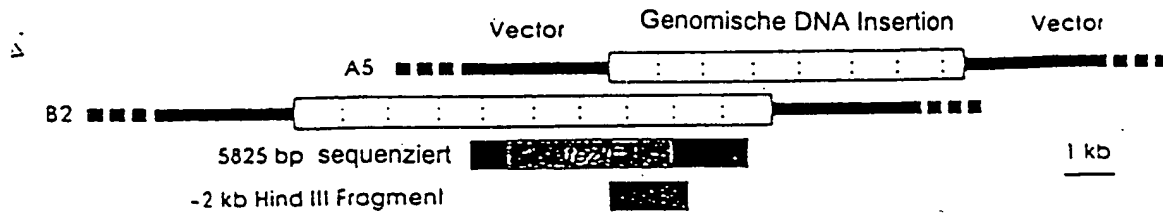


Figur 54

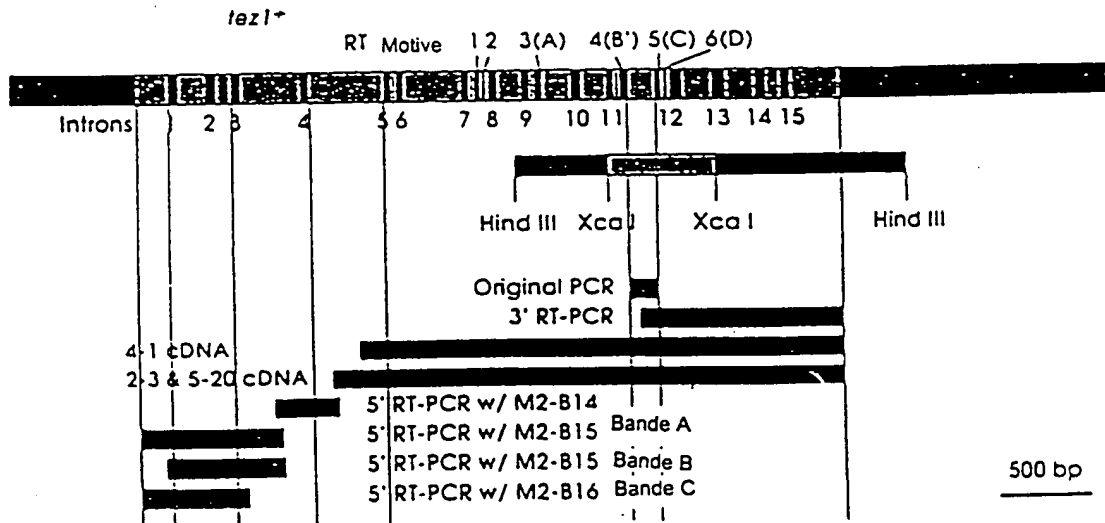
S-1: FFY VTE TTF QKN RLF FYR KSV WSK  
S-2: RQH LKR VQL RDV SEA EVR QHR EA  
S-3: AFT FRR EKR AER LTS RVK ALF SVL NYE

A-1: AKF LHW LMS VYV VEL LRS FFY VTE TTF Q .  
A-2: LFF YRK SVW SKL QSI GIR QHL KRV QLR DVS  
A-3: PAL LTS RLR FIP KPD GLR PIV NMD YVV

Figur 55



3



Figur 56

Poly 4

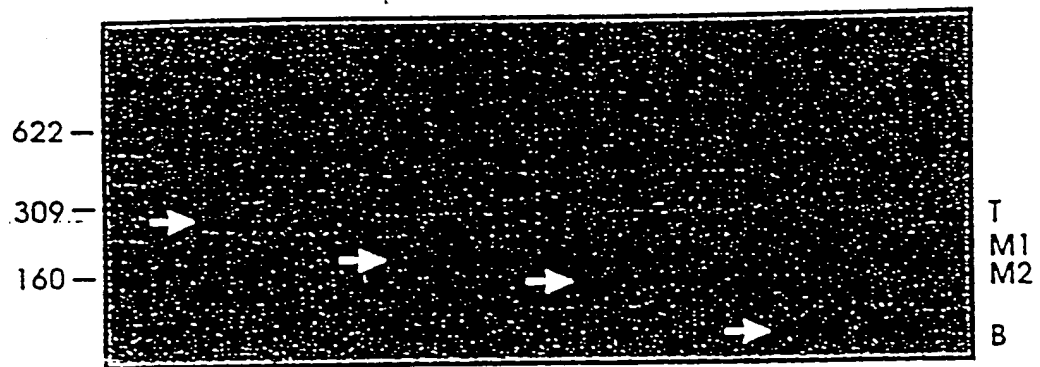
			t		t		c		
	t	a	a	g	c	c	t	c	g
5'-	cag	acc	aaa	gga	att	cca	taa	gg	-3'
	Q	T	K	G	I	P	Q	G	

4 (B')

## 5 (c')

	D	D	Y	L	L	I	T	
3'-	ctg	ctg	atg	gag	gag	tag	tgg	-5'
	a	a	a	a	a	a	a	
				t	t	t	t	
						c	c	
						<u>Poly 1</u>		

Figur 57



Motiv B' (4)  
QTKGIPQG

Motiv C (5)  
DDYLLIT

Figur 58

# PCR-Produkt M2 zeigte gute Übereinstimmung mit anderen Telomerase Proteinen

```

Ot          LCVSYILSSFYYANLEENALQFLRKESMDPEKPETNLLMRLT
Ea_p123     KGIPQGLCVSSILSSFYYATLEESSLGFLRDESMNPENPNVNLLMRLTDDYLLIT
Sp_M2       SILSSFLCHFYMEDLIDEYLSFTKKK-----GSVLLRVV
Sc_p103     DGLFQGSSLSAPIVDLVYDDLLEFYSEFKASPS-----QDTLILKLADDFLIIS
            *               *               *               *

```

```

Q   K   V   G   I   P   Q   G
aa aaa gtc ggc atc cct cag gg..... <--- tatsächliche genomische Sequenz

```

Poly 4

```

      c       c       c
c a   a   g   c   c   t c g
cag acc aaa gga att cca taa gg ---->

```

```

ag acc aaa gga att cca tca ggC TCA ATT CTG TCA TCT TTT TTG TGT CAT TTC TAT ATG
tc tgg ttt cct taa ggt agt ccG AGT TAA GAC AGT AGA AAA AAC ACA GTA AAG ATA TAC

```

```

K   G   :   P   S   G   S   I   L   S   S   F   L   C   H   F   Y   M

```

```

GAA GAT TTG ATT GAT GAA TAC CTA TCG TTT ACG AAA AAG AAA GGA TCA GTG TTG TTA CGA
CTT CTA AAC TAA CTA CTT ATG GAT AGC AAA TGC TTT TTC TTT CCT AGT CAC AAC AAT GCT

```

```

E   D   L   I   D   E   Y   L   S   F   T   K   K   K   G   S   V   L   L   R

```

```

GTA GTC gac gac tac ctc ctc atc acc
CAT CAG ctg ctg atg gag gag tag tgg

```

```

V   V   D   D   Y   L   L   I   T

```

```

<---- ctg ctg atg gag gag tag tgg
      a   a   a   a   a   a   a   a
          c   c   c   c
              c   c

```

Poly 1

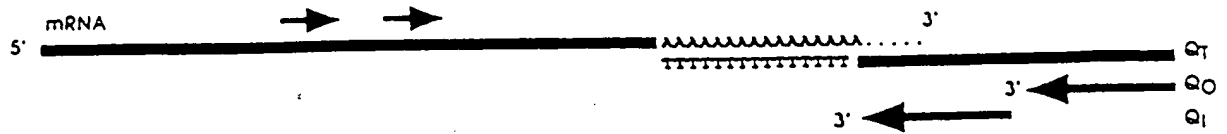
```

.....gac gat ttc ctc ttc ata aca..... <--- tatsächliche genomische Sequenz
      D   D   F   L   F   I   T

```

Figur 59

## 3' RT PCR Strategie



1. Synthese von cDNA mit  $Q_T$  Primer.



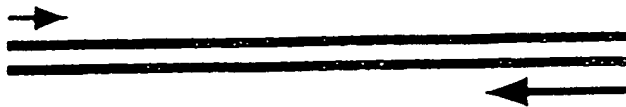
2. Erste Runde PCR mit äußerem Primer und  $Q_O$  Primer



3. Zweite Runde PCR mit innerem Primer und  $Q_I$  Primer



4. Sequenzierung der Produkte der zweiten Runde PCR mit innerem oder  $Q_I$  Primer



Figur 60

A

- Nach Größe ausgewählte Banken von P. Nurese

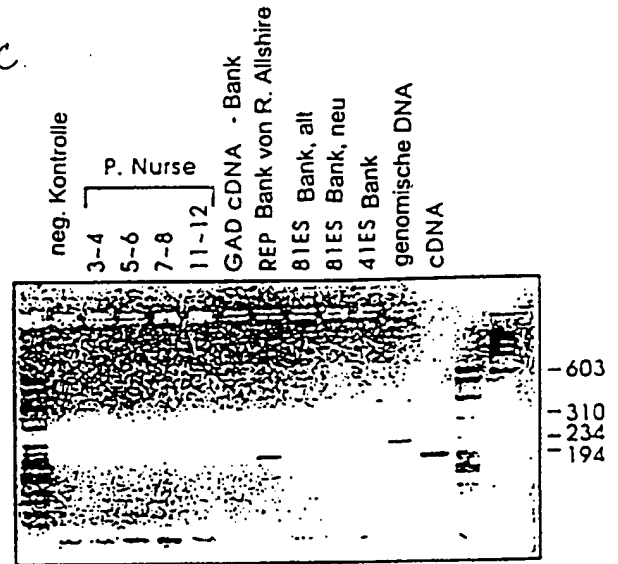
3 - 4 kb  
 5 - 6 kb  
 7 - 8 kb  
 11 - 12 kb

Banken von J.A. Wise  
 Sau 3a Partialverdau  
 Hind III Partialverdau

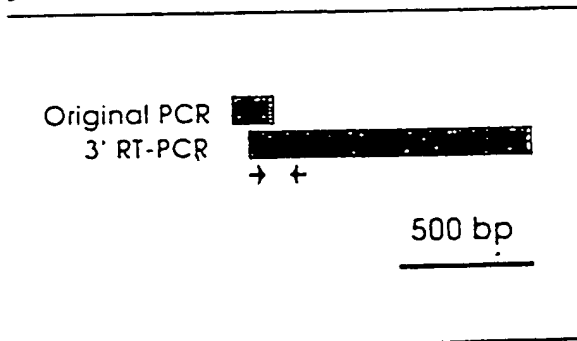
cDNA Banken:

GAD (Gal Aktivitätsdomäne) Bank  
 REP Bank von R. Allshire  
 REP81ES Bank (alt)  
 REP81ES Bank (neu)  
 REP41ES Bank

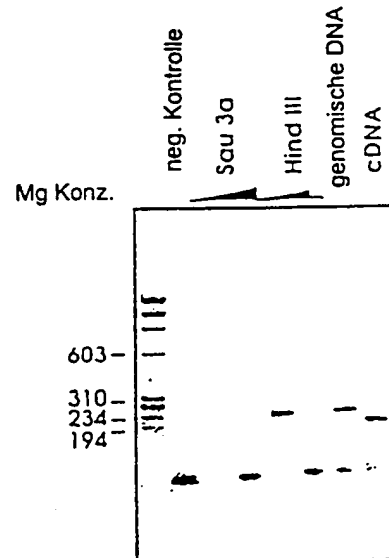
C



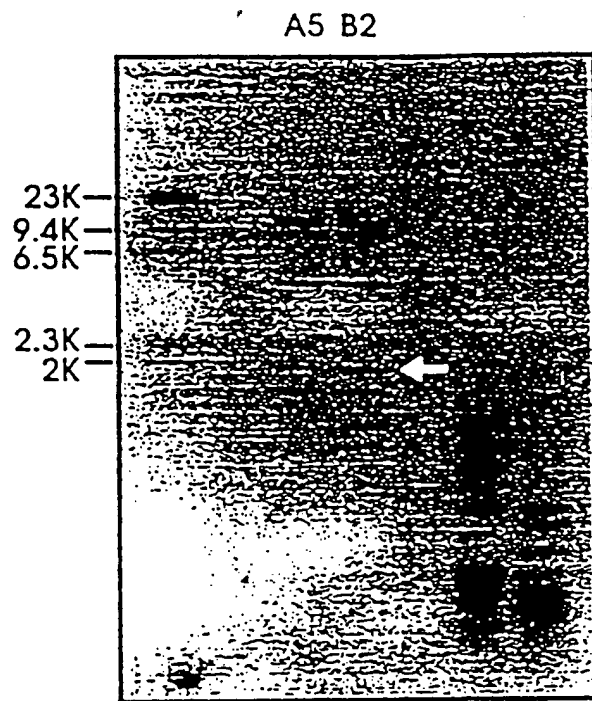
3.



D.



Figur 61

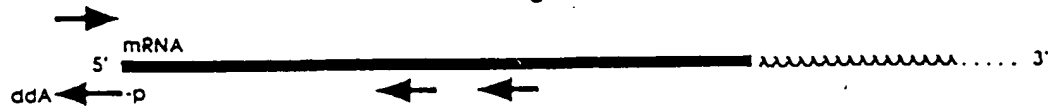


Hind III gespaltene positive genomische Clone



Figur 62

# 5' RT PCR Strategie



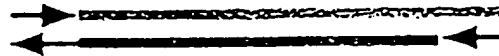
1. Synthese von cDNA mit spezifischem "stromabwärts"-Primer.



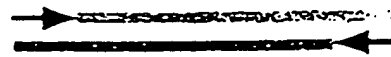
2. Ligation Oligo mit 5'-P und blockiertem 3' zu cDNA mit T4 RNA Ligase.



3. Erste Runde PCR



- Zweite Runde PCR



Figur 63

# Ausrichtung von RT-Domänen von Telomerase-katalytischen Untereinheiten

Motiv 0		
S.p. Tez1p	(429) . WLYNSFIIPILQSFYITESSDLRNRTVYFRKDIW ... (35) ...	
S.c. Est2p	(366) . WLFRLIPKIIQTFFYCTEISSTVT-IVYFRHDTW ... (35) ...	
E.a. p123	(441) . WIFEDLVVSLIRCFYVTEQQKSYSKTYYYRKNIW ... (35) ...	
* * * * *		
Motiv 1      Motiv 2      K		
	p h h h K      h R h      R	
S.p. Tez1p	AVIRLLPKK--NTFRLITN-LRKRF ... (61) ...	
S.c. Est2p	SKMRIIPKKSNNEFRIIAIPCRGAD ... (62) ...	
E.a. p123	GHLRLIPKK--TTFRPIMTFNKKIV ... (61) ...	
* * * * *		
Motiv 3(A) AF		
	h hDh GY h	
S.p. Tez1p	KKYFVRIDIKSCYDRIKQDLMFRIVK ... (89) ...	
S.c. Est2p	ELYFMKFDVNSCYDSIPRMECMRILK ... (75) ...	
E.a. p123	KLFFATMDIEKCYDSVNREKLSTFLK ... (107) ...	
* * * * *		
Motiv 4 (B')		
	hPQG      pP h h      h	
S.p. Tez1p	YLQKVGIPQGSILSSFLCHFYMEDLIDEYLSF ... (6) ...	
S.c. Est2p	YIREDGLFQGSSLSAPIVDLVTDLLLEYSEF ... (8) ...	
E.a. p123	YKQTKGIPQGLCVSSILSSFYATLEESSLGF ... (14) ...	
* * * * *		
Y Motiv 5(C)		Motiv 6(D)
	h F DDhhh	Gh h cK h
S.p. Tez1p	VLLRVVDDFLFITVNKKDAKKFLNLSLRGFEXHNFSTSLKTVINFENS . (205)	
S.c. Est2p	LILKLADDFLIISTDQQQVINIKKLAMGGFQKYNAKANRDKILAVSSQS . (173)	
E.a. p123	LIMRLTDDYLLITQENNAVLFIKLINVSRENGFKFMKKLQTSFPLS . (209)	
* * * * *		

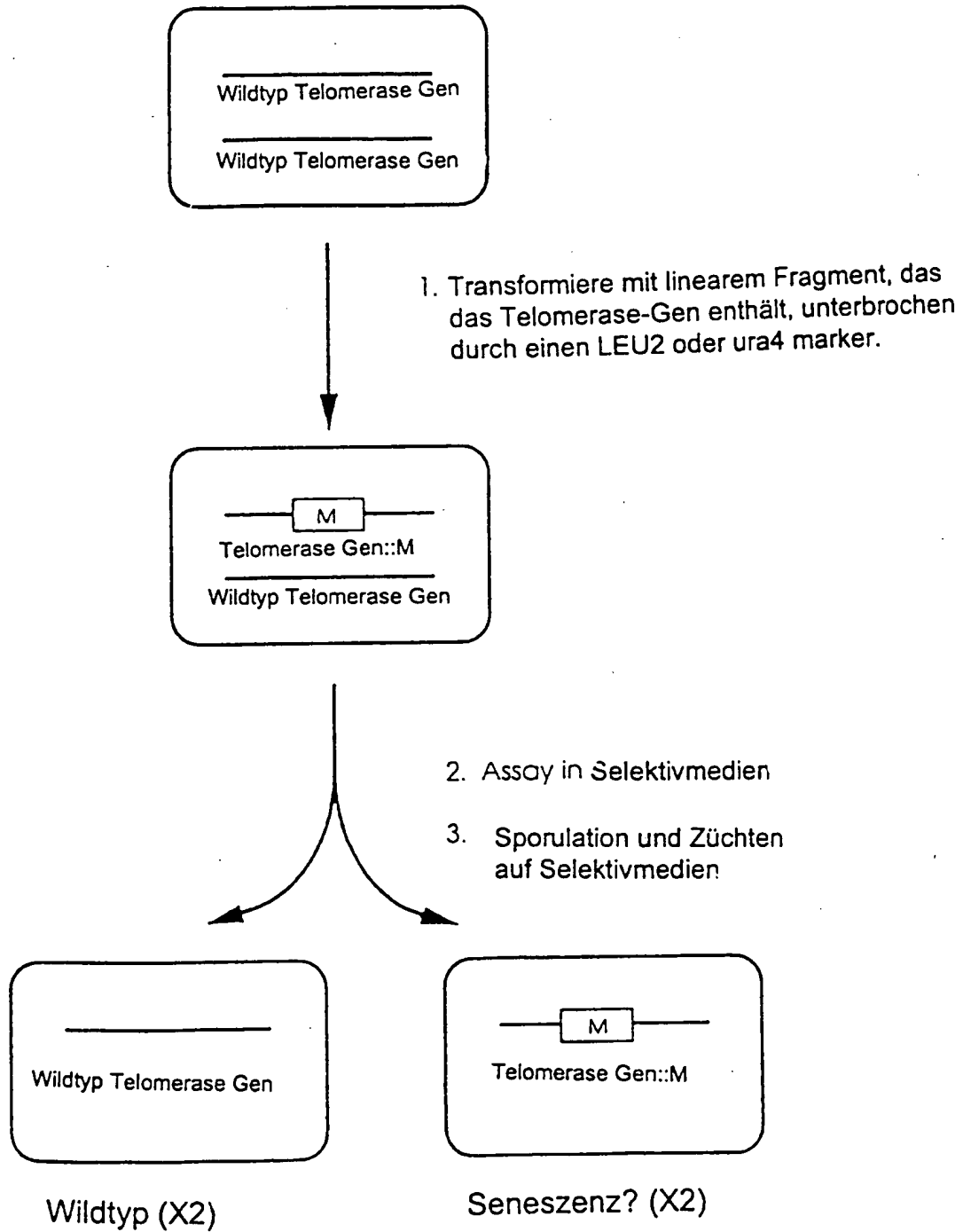
Figur 64

A

B

Figur 65

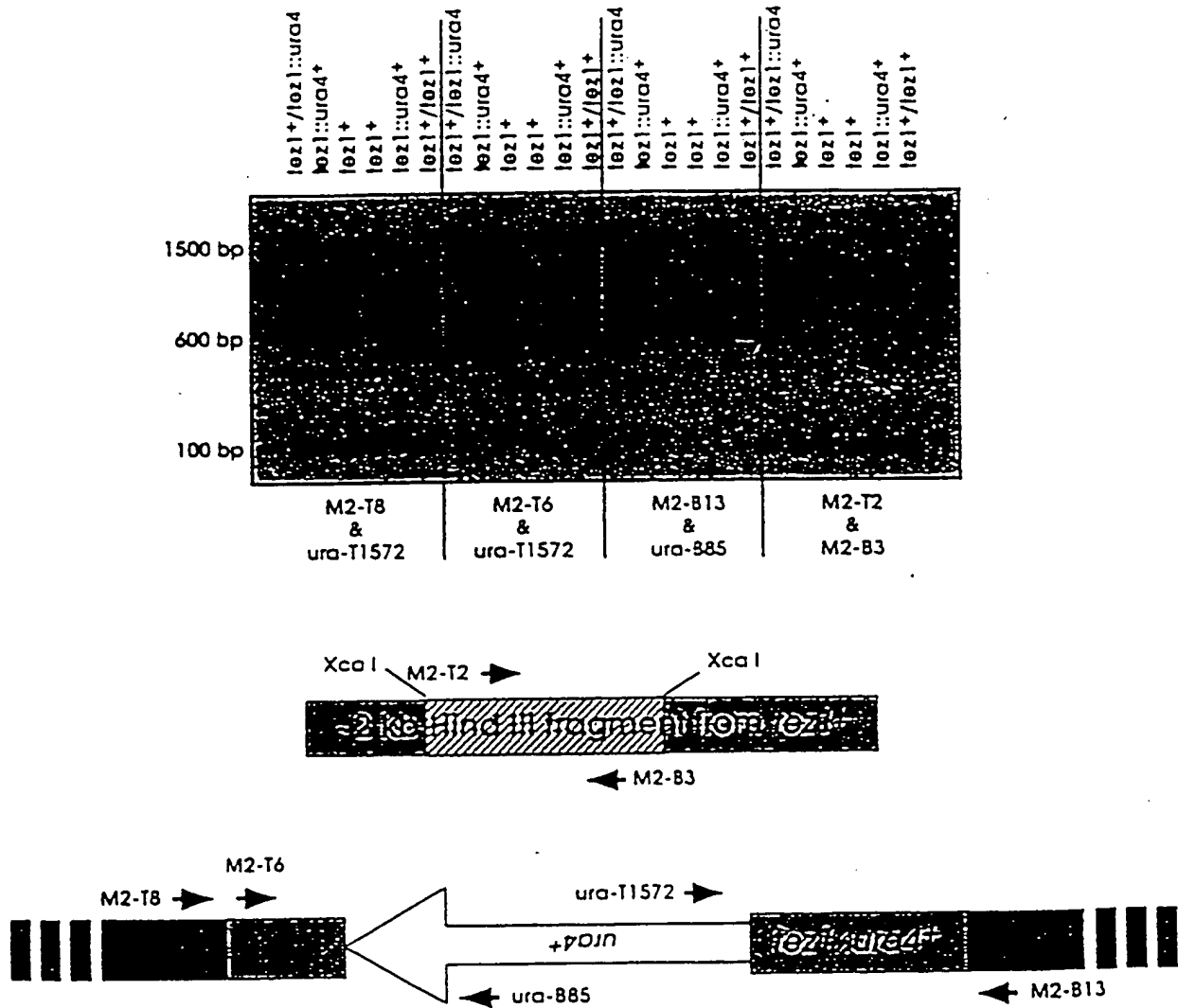
## Disruptions-Strategie für die vermuteten Telomerase-Gene.



(Diese Zellen zeigen einen Seneszenzphänotyp, falls das unterbrochene Gen eine Telomeraseuntereinheit codiert.)

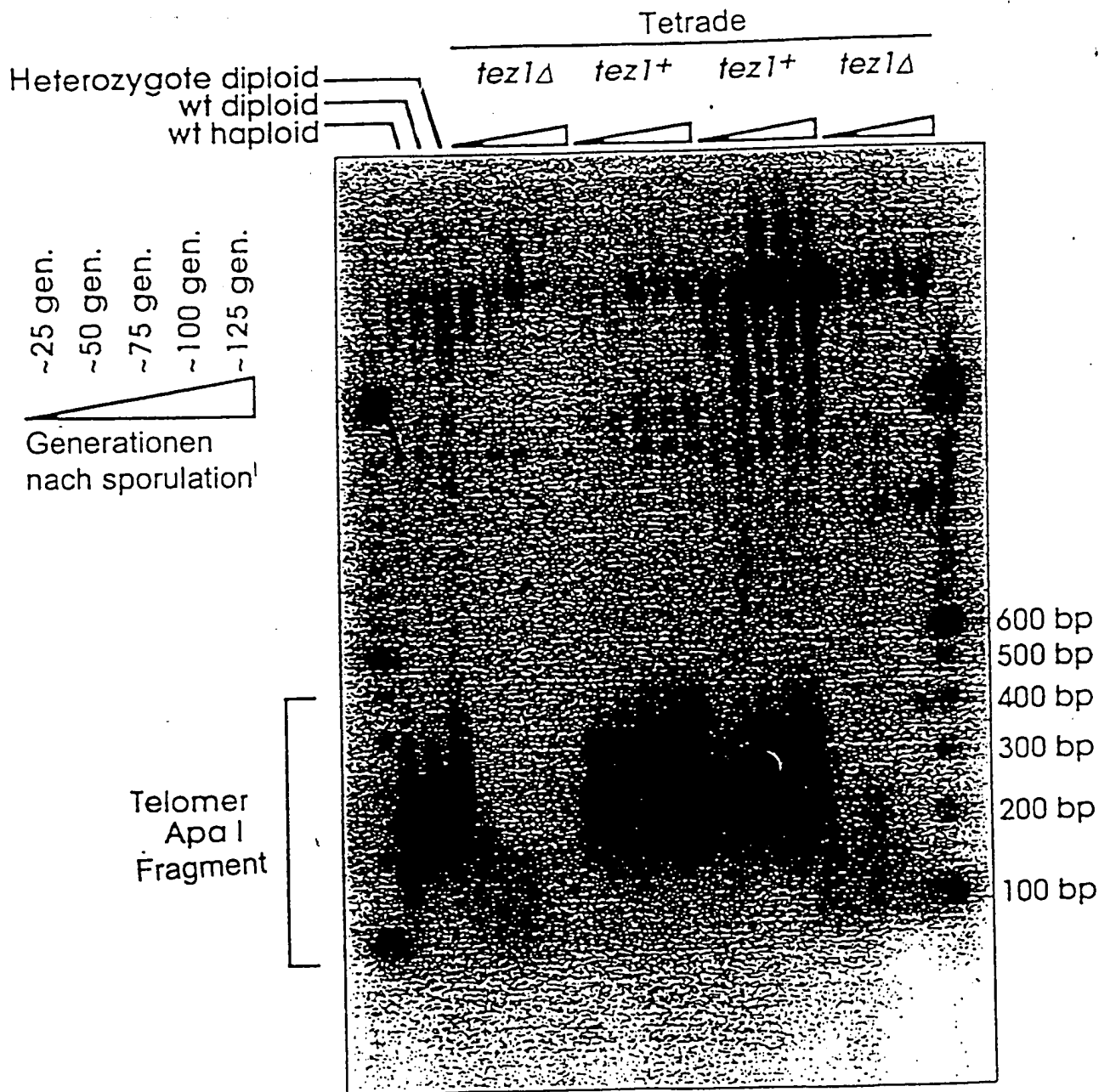
Figur 66

Ein Beispiel für die Bestätigung der *tez1* Disruption durch PCR



Figur 67

Tez1-Disruption führt zu zunehmender Verkürzung von  
Telomeren in *S. pombe*



Figur 68

```

GCCAAGTTCCTGCACTGGCTG      met ser val tyr val val glu leu leu
                                ATG AGT GTG TAC GTC GTC GAG CTG CTC

    10                                20
arg ser phe phe tyr val thr glu thr thr phe gln lys asn arg
AGG TCT TTC TTT TAT GTC ACG GAG ACC ACG TTT CAA AAG AAC AGG

                                30
leu phe phe tyr arg lys ser val trp ser lys leu gln ser ile
CTC TTT TTC TAC CGG AAG AGT GTC TGG AGC AAG TTG CAA AGC ATT

    40                                50
gly ile arg gln his leu lys arg val gln leu arg glu leu ser
GGA ATC AGA CAG CAC TTG AAG AGG GTG CAG CTG CGG GAG CTG TCG

                                60
glu ala glu val arg gln his arg glu ala arg pro ala leu leu
GAA GCA GAG GTC AGG CAG CAT CGG GAA GCC AGG CCC GCC CTG CTG

    70                                80
thr ser arg leu arg phe ile pro lys pro asp gly leu arg pro
ACG TCC AGA CTC CGC TTC ATC CCC AAG CCT GAC GGG CTG CGG CCG

                                90
ile val asn met asp tyr val val gly ala arg thr phe arg arg
ATT GTG AAC ATG GAC TAC GTC GTG GGA GCC AGA ACG TTC CGC AGA

    100                                110
glu lys      ala glu arg leu thr ser arg val lys ala leu phe
GAA AAG ARG GCC GAG CGT CTC ACC TCG AGG GTG AAG GCA CTG TTC

                                120
ser val leu asn tyr glu arg ala arg arg pro gly leu leu gly
AGC GTG CTC AAC TAC GAG CGG GCG CGG CGC CCC GGC CTC CTG GGC

    130                                140
ala ser val leu gly leu asp asp ile his arg ala trp arg thr
GCC TCT GTG CTG GGC CTG GAC GAT ATC CAC AGG GCC TGG CGC ACC

                                150
phe val leu arg val arg ala gln asp pro pro pro glu leu tyr
TTC GTG CTG CGT GTG CGG GCC CAG GAC CCG CCG CCT GAG CTG TAC

                                170
phe val lys val asp val thr gly ala tyr asp thr ile pro gln
TTT GTC AAG GTG GAT GTG ACG GGC GCG TAC GAC ACC ATC CCC CAG

                                180
asp arg leu thr glu val ile ala ser ile ile lys pro gln asn
GAC AGG CTC ACG GAG GTC ATC GCC AGC ATC ATC AAA CCC CAG AAC

```

Figur 68 (Fortsetzung)

```

190                                     200
thr tyr cys val arg arg tyr ala val val gln lys ala ala met
ACG TAC TGC GTG CGT CGG TAT GCC GTG GTC CAG AAG GCC GCC ATG

                                     210
gly thr ser ala arg pro ser arg ala thr ser tyr val gln cys
GGC ACG TCC GCA AGG CCT TCA AGA GCC ACG TCC TAC GTC CAG TGC

220                                     230
gln gly ile pro gln gly ser ile leu ser thr leu leu cys ser
CAG GGG ATC CCG CAG GGC TCC ATC CTC TCC ACG CTG CTC TGC AGC

                                     240
leu cys tyr gly asp met glu asn lys leu phe ala gly ile arg
CTG TGC TAC GGC GAC ATG GAG AAC AAG CTG TTT GCG GGG ATT CGG

250                                     260
arg asp gly leu leu leu arg leu val asp asp phe leu leu val
CGG GAC GGG CTG CTC CTG CGT TTG GTG GAT GAT TTC TTG TTG GTG

                                     270
thr pro his leu thr his ala lys thr phe leu arg thr leu val
ACA CCT CAC CTC ACC CAC GCG AAA ACC TTC CTC AGG ACC CTG GTC

280                                     290
arg gly val pro glu tyr gly cys val val asn leu arg lys thr
CGA GGT GTC CCT GAG TAT GGC TGC GTG GTG AAC TTG CGG AAG ACA

                                     300
val val asn phe pro val glu asp glu ala leu gly gly thr ala
GTG GTG AAC TTC CCT GTA GAA GAC GAG GCC CTG GGT GGC ACG GCT

310                                     320
phe val gln met pro ala his gly leu phe pro trp cys gly leu
TTT GTT CAG ATG CCG GCC CAC GGC CTA TTC CCC TGG TGC GGC CTG

                                     330
leu leu asp thr arg thr leu glu val gln ser asp tyr ser ser
CTG CTG GAT ACC CGG ACC CTG GAG GTG CAG AGC GAC TAC TCC AGC

340                                     350
tyr ala arg thr ser ile arg ala ser leu thr phe asn arg gly
TAT GCC CGG ACC TCC ATC AGA GCC AGT CTC ACC TTC AAC CGC GGC

                                     360
phe lys ala gly arg asn met arg arg lys leu phe gly val leu
TTC AAG GCT GGG AGG AAC ATG CGT CGC AAA CTC TTT GGG GTC TTG

370                                     380
arg leu lys cys his ser leu phe leu asp leu gln val asn ser
CGG CTG AAG TGT CAC AGC CTG TTT CTG GAT TTG CAG GTG AAC AGC

```



Figur 68 (Fortsetzung)

```

                                390
leu gln thr val cys thr asn ile tyr lys ile leu leu leu gln
CTC CAG ACG GTG TGC ACC AAC ATC TAC AAG ATC CTC CTG CTG CAG

400                                410
ala tyr arg phe his ala cys val leu gln leu pro phe his gln
GCG TAC AGG TTT CAC GCA TGT GTG CTG CAG CTC CCA TTT CAT CAG

                                420
gln val trp lys asn pro his phe ser cys ala ser ser leu thr
CAA GTT TGG AAG AAC CCA CAT TTT TCC TGC GCG TCA TCT CTG ACA

430                                440
arg leu pro leu leu leu his pro glu ser gln glu arg arg asp
CGG CTC CCT CTG CTA CTC CAT CCT GAA AGC CAA GAA CGC AGG GAT

                                450
val ala gly gly gln gly arg arg arg pro ser ala leu arg gly
GTC GCT GGG GGC CAA GGG CGC CGC CGG CCC TCT GCC CTC CGA GGC

460                                470
arg ala val ala val pro pro ser ile pro ala gln ala asp ser
CGT GCA GTG GCT GTG CCA CCA AGC ATT CCT GCT CAA GCT GAC TCG

                                480
thr pro cys his leu arg ala thr pro gly val thr gln asp ser
ACA CCG TGT CAC CTA CGT GCC ACT CCT GGG GTC ACT CAG GAC AGC

490                                500
pro asp ala ala glu ser glu ala pro gly asp asp ala asp cys
CCA GAC GCA GCT GAG TCG GAA GCT CCC GGG GAC GAC GCT GAC TGC

                                510
pro gly gly arg ser gln pro gly thr ala leu arg leu gln asp
CCT GGA GGC CGC AGC CAA CCC GGC ACT GCC CTC AGA CTT CAA GAC

520                                530
his pro gly leu met ala thr arg pro gln pro gly arg glu gln
CAT CCT GGA CTG ATG GCC ACC CGC CCA CAG CCA GGC CGA GAG CAG

                                540
thr pro ala ala leu ser arg arg ala tyr thr ser gln gly gly
ACA CCA GCA GCC CTG TCA CGC CGG GCT TAT ACG TCC CAG GGA GGC

550                                560
arg gly gly pro his pro gly leu his arg trp glu ser glu ala
AGG GGC GGC CCA CAC CCA GGC CTG CAC CGC TGG GAG TCT GAG GCC

564
OP
TGA GTGAGTGT TTTGGCCGAGGCCTGCATGTCCGGCTGAAGGCTGAGTGTCCGGCTGAGGC
CTGAGCGAGTGTCCAGCCAAGGGCTGAGTGTCCAGCACACCTGCGTTTTCACTTCCCCAC

```

Figur 68 (Fortsetzung)

AGGCTGGCGTTCGGTCCACCCCAGGGCCAGCTTTTCCTCACCAGGAGCCCGGCTTCCACT  
CCCCACATAGGAATAGTCCATCCCCAGATTGCGCCATTGTTCACCCTTCGCCCTGCCTTCC  
TTTGCCTTCCACCCCCACCATTTCAGGTGGAGACCCTGAGAAGGACCCTGGGAGCTTTGGG  
AATTTGGAGTGACCAAAGGTGTGCCCTGTACACAGGCGAGGACCCTGCACCTGGATGGGG  
GTCCCTGTGGGTCAAATTGGGGGGAGGTGCTGTGGGAGTAAAATACTGAATATATGAGTT  
TTTCAGTTTTTGAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

Figur 69

## Motiv-1

Ep p123 ...LVVSLIRCFYVTEQQKSYSKT...  
 Sp Tez1 ...FIIPILQSFFYITESSDLRNRT...  
 Sc Est2 ...LIPKJIQTFFYCTEISSTVTIV...  
 Hs TCP1 ...YVVELLRSFFYVTETTFQKNRL...  
 "consensus" FFY TE

Motiv 0 K  
 p hhh K hR h R  
 Ep p123 ...KSLGFAPGKLRLLIPKKT-TFRPIMTFNKKIV...  
 Sp Tez1 ...QKTTLPPAVIRLLPKKN--TFRLITNLRKRFL...  
 Sc Est2 ...TLSNFNHSMRIIPKKSNNFRIIAIPCRGAD...  
 Hs TCP1 ...ARPALLTSRLRFIPKPD--GLRPIVNMDYVVG...  
 "consensus" R PK RI

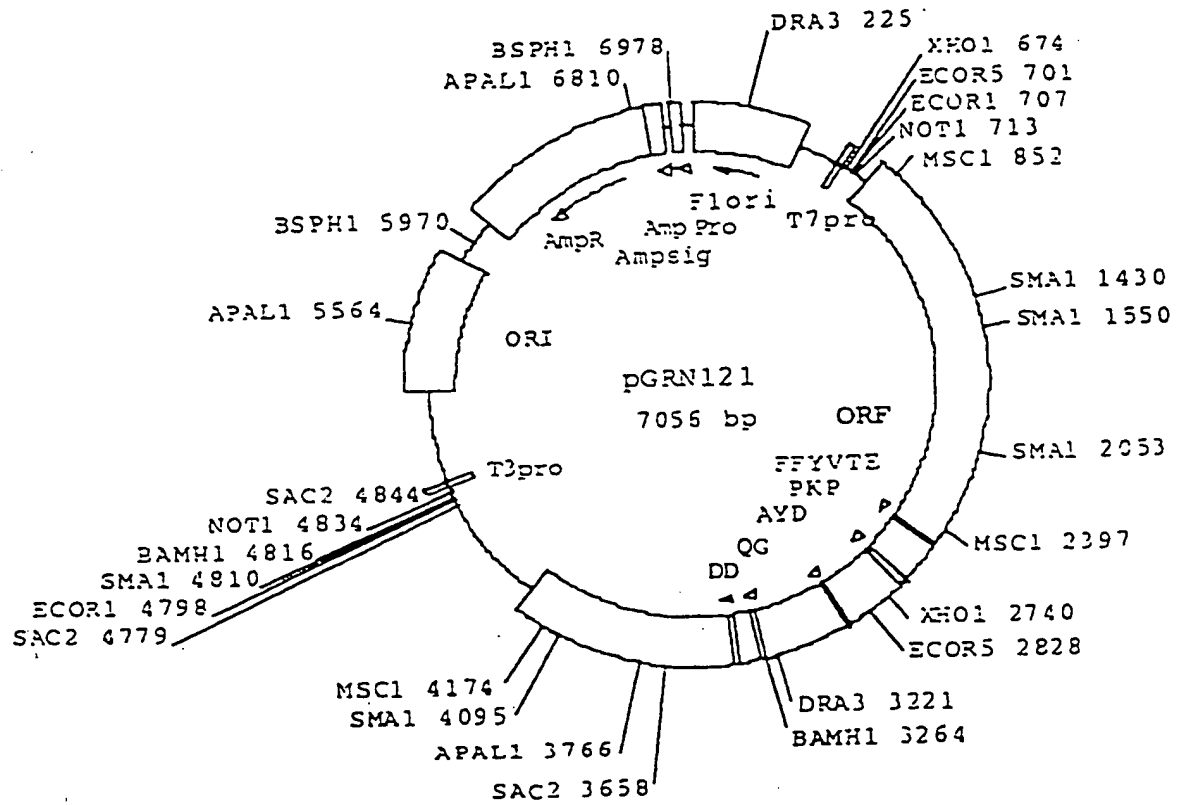
Motiv A AF  
 h hDh GY h  
 Ep p123 ...PKLFFATMDIEKCYDSVNREKLSTFLK...  
 Sp Tez1 ...RKKYFVRIDIKSCYDRIKQDLMFRIVK...  
 Sc Est2 ...PELYFMKFDVKSCYDSIPRMECMRILK...  
 Hs TCP1 ...PELYFVKVDVTGAYDTIPQDRLTEVIA...//...  
 "consensus" F D YD

Motiv B hPQG pS hh  
 Ep p123 ...NGKFYKQTKGIPQGLCVSSILSSFYYA...  
 Sp Tez1 ...GNSQYLQKVGIPQGSILSSFLCHFYME...  
 Sc Est2 ...EDKCYIREDGLFQGSSLSAPIVDLVYD...  
 Hs TCP1 ...RATSYVQCQGIPQGSILSTLLCSLCYG...  
 "consensus" G QG S

Motiv C Y  
 h F DDhhh  
 Ep p123 ...PNVNLLMRLTDDYLLITTQENN...  
 Sp Tez1 ...KKGSVLLRVVDDFLFITVNKKD...  
 Sc Est2 ...SQDTLILKLADDFLIISTDQQQ...  
 Hs TCP1 ...RRDGLLLRLVDDFLLVTPHLTH...  
 "consensus" DD L

Motiv D Gh h cK  
 Ep p123 ...NVSRENGFKFNMKKL...  
 Sp Tez1 ...LNLSLRGFEEKHNFST...  
 Sc Est2 ...KKLAMGGFQKYNKA...  
 Hs TCP1 ...LRTLVRGVPEYGCVV...  
 "consensus" G

Figur 70



Figur 71

1 GCAGCGCTGC GTCCTGCTGC GCACGTGGGA AGCCCTGGCC CCGGCCACCC  
 51 CCGCGATGCC GCGCGCTCCC CGCTGCCGAG CCGTGCGCTC CCTGCTGCGC  
 101 AGCCACTACC GCGAGGTGCT GCCGCTGGCC ACGTTCGTGC GGCGCCTGGG  
 151 GCCCCAGGGC TGGCGGCTGG TGCACGCGCG GGACCCGGCG GCTTTCCGCG  
 201 CGNTGGTGGC CCANTGCNTG GTGTGCGTGC CCTGGGANGN ANGGCNGCCC  
 251 CCCGCCGCCC CCTCCTTCCG CCAGGTGTCC TGCCTGAANG ANCTGGTGGC  
 301 CCGAGTGCTG CANANGCTGT GCGANCGCGG CGCGAANAAC GTGCTGGCCT  
 351 TCGGCTTCGC GCTGCTGGAC GGGGCCCGCG GGGGCCCCCC CGAGGCCTTC  
 401 ACCACCAGCG TGCAGCTA CCTGCCAAC ACGGTGACCG ACGCACTGCG  
 451 GGGGAGCGGG GCGTGGGGGC TGCTGCTGCG CCGCGTGGG GACGACGTGC  
 501 TGGTTCACCT GCTGGCACGC TGC GCGTNT TGTGCTGGT GGNTCCCAGC  
 551 TGC GCTACC ANGTGTGCG GCGCGCTG TACCAGCTCG GCGCTGCNAC  
 601 TCAGGCCCGG CCCCCGCCAC ACGCTANTGG ACCCGAANGC GTCTGGGATC  
 651 CAACGGGCCT GGAACCATAG CGTCAGGGAG GCCGGGGTCC CCCTGGGCTG  
 701 CCAGCCCCGG GTGCGAGGAG GCGCGGGGGC AGTGCCAGCC GAAGTCTGCC  
 751 GTTGCCCAAG AGGCCAGGC GTGGCGCTGC CCCTGAGCCG GAGCGGACGC  
 801 CCGTTGGGCA GGGGTCCTGG GCCACCCGG GCAGGACGCC TGGACCGAGT  
 851 GACCGTGGTT TCTGTGTGGT GTCACCTGCC AGACCCGCCG AAGAAGCCAC  
 901 CTCTTTGGAG GGTGCGCTCT CTGGCACGCG CCACTCCAC CCATCCGTGG  
 951 GCCGCCAGCA CCACGCGGGC CCCCCATCCA CATCGCGGCC ACCACGTCCT  
 1001 GGGACAAGCC TTGTCCCCCG GTGTACGCCG AGACCAAGCA CTTCCTCTAC  
 1051 TCCTCAGGCG ACAAGNACAC TGCNCCCTC CTTCCTACTC AATATATCTG  
 1101 AGGCCAGCC TGA CTGGCGT TCGGGAGGTT CGTGGAGACA NTCTTTCTGG  
 1151 TTCCAGGCCT TGGATGCCAG GATTCGCCG AGGTTGCCCC GCCTGCCCCA  
 1201 GCGNCTACTGG CAAATGCGGC CCCTGTTTCT GGAGCTGCTT GGGAACCACG  
 1251 CGCAGTGCCC CTACGGGGTG TTCCTCAAGA CGCACTGCCC GCTGCGAGCT  
 1301 GCGGTCACCC CAGCAGCCGG TGTCTGTGCC CGGGAGAAGC CCCAGGGCTC  
 1351 TGTGGCGGCC CCCGAGGAGG AGGAACACAG ACCCCCGTCG CCTGGTGCAG  
 1401 CTGCTCCGCC AGCACAGCAG CCCCTGGCAG GTGTACGGCT TCGTGCGGGC  
 1451 CTGCTGCGC CGGCTGGTGC CCCCAGGCCT CTGGGGCTCC AGGCACAACG  
 1501 AACGCCGCTT CCTCAGGAAC ACCAAGAAGT TCATCTCCCT GGGGAAGCAT  
 1551 GCCAAGCTCT CGCTGCAGGA GCTGACGTGG AAGATGAGCG TCGGGGACTG  
 1601 CGCTTGGCTG CGCAGGAGCC CAGGGGTTGG CTGTGTTCCG GCCGCAGAGC  
 1651 ACCGTCTGCG TGAGGAGATC CTGGCCAAGT TCCTGCACTG GCTGATGAGT  
 1701 GTGTACGTCG TCGAGCTGCT CAGGTCTTTC TTTTATGTCA CGGAGACCAC  
 1751 GTTTCAAAAG AACAGGCTCT TTTTCTACCG GAAGAGTGTC TGGAGCAAGT  
 1801 TGCAAAGCAT TGGAATCAGA CAGCACTTGA AGAGGGTGCA GCTGCGGGAG  
 1851 CTGTGCGAAG CAGAGGTCAG GCAGCATCGG GAAGCCAGGC CCGCCCTGCT  
 1901 GACGTCCAGA CTCCGCTTCA TCCCCAAGCC TGACGGGCTG CGGCCGATTG  
 1951 TGAACATGGA CTACGTCGTG GGAGCCAGAA CGTTCCGCAG AGAAAAGAGG  
 2001 GCCGAGCGTC TCACCTCGAG GGTGAAGGCA CTGTTACGCG TGCTCAACTA  
 2051 CGAGCGGGCG CGGCGCCCCG GCCTCCTGGG CGCCTCTGTG CTGGGCCTGG  
 2101 ACGATATCCA CAGGGCCTGG CGCACCTTCG TGCTGCGTGT GCGGGCCAG  
 2151 GACCCGCCGC CTGAGCTGTA CTTTGTCAAG GTGGATGTGA CGGGCGCGTA  
 2201 CGACACCATC CCCCAGGACA GGCTCACGGA GGTCATCGCC AGCATCATCA  
 2251 AACCCAGAA CACGTACTGC GTGCGTCGGT ATGCCGTGGT CCAGAAGGCC

Figur 71(Fortsetzung)

2301 GCCCATGGGC ACGTCCGCAA GGCCTTCAAG AGCCACGTCT CTACCTTGAC  
 2351 AGACCTCCAG CCGTACATGC GACAGTTCGT GGCTCACCTG CAGGANAACA  
 2401 GCCCGCTGAG GGATGCCGTC GTCATCGAGC AGAGCTCCTC CCTGAATGAG  
 2451 GCCAGCAGTG GCCTCTTCGA CGTCTTCCTA CGCTTCATGT GCCACCACGC  
 2501 CGTGCGCATC AGGGGCAAGT CCTACGTCCA GTGCCAGGGG ATCCCGCAGG  
 2551 GCTCCATCCT CTCCACGCTG CTCTGCAGCC TGTGCTACGG CGACATGGAG  
 2601 AACAAGCTGT TTGCGGGGAT TCGGCGGGAC GGGGTGCTCC TGC GTTTGGT  
 2651 GGATGATTTC TTGTTGGTGA CACCTCACCT CACCCACGCG AAAACCTTCC  
 2701 TCAGGACCCT GGTCCGAGGT GTCCCTGAGT ATGGCTGCGT GGTGAACTTG  
 2751 CGGAAGACAG TGGTGAACCT CCCTGTAGAA GACGAGGCC TGGGTGGCAG  
 2801 GGCTTTTGTT CAGATGCCGG CCCACGGCCT ATCCCTGG TCGGCGCTGC  
 2851 TGCTGGATAC CCGGACCCTG GAGGTGCAGA GCGACTACTC CAGCTATGCC  
 2901 CGGACCTCCA TCAGAGCCAG TCTCACCTTC AACC GCGGCT TCAAGGCTGG  
 2951 GAGGAACATG CGTCGCAAAC TCTTTGGGGT CTTGCGGCTG AAGTGTACA  
 3001 GCCTGTTTCT GGATTTGCAG GTGAACAGCC TCCAGACGGT GTGCACCAAC  
 3051 ATCTACAAGA TCCTCCTGCT GCAGGCGTAC AGGTTTCACG CATGTGTGCT  
 3101 GCAGCTCCCA TTTCATCAGC AAGTTTGGAA GAACCCACACA TTTTCTCTGC  
 3151 GCGTCATCTC TGACACGGCC TCCCTCTGCT ACTCCATCCT GAAAGCCAAG  
 3201 AACGCAGGGA TGTGCTGGG GGCCAAGGGC GCCGCCGGCC CTCTGCCCTC  
 3251 CGAGGCCGTG CAGTGGCTGT GCCACCAAGC ATTCCTGCTC AAGCTGACTC  
 3301 GACACCGTGT CACCTACGTG CCACTCCTGG GGTCCTCAG GACAGCCAG  
 3351 ACGCAGCTGA GTCGGAAGCT CCCGGGGACG ACGCTGACTG CCCTGGAGGC  
 3401 CGCAGCCAAC CCGGCACTGC CCTCAGACTT CAAGACCATC CTGGACTGAT  
 3451 GGCCACCCGC CCACAGCCAG GCCGAGAGCA GACACCAGCA GCCCTGTCAC  
 3501 GCCGGGCTCT ACGTCCCAGG GAGGGAGGGG CGGCCACAC CCAGGCCCGC  
 3551 ACCGCTGGGA GTCTGAGGCC TGAGTGAGTG TTTGGCCGAG GCCTGCATGT  
 3601 CCGGCTGAAG GCTGAGTGTC CGGCTGAGGC CTGAGCGAGT GTCCAGCCAA  
 3651 GGGCTGAGTG TCCAGCACAC CTGCCGTCTT CACTTCCCCA CAGGCTGGCG  
 3701 CTCGGCTCCA CCCCAGGGCC AGCTTTTCTT CACCAGGAGC CCGGCTTCCA  
 3751 CTCCCCACAT AGGAATAGTC CATCCCCAGA TTCGCCATTG TTCACCCCTC  
 3801 GCCCTGCCCT CTTTGCCTT CCACCCCCAC CATCCAGGTG GAGACCCTGA  
 3851 GAAGGACCCT GGGAGCTCTG GGAATTTGGA GTGACCAAAG GTGTGCCCTG  
 3901 TACACAGGCG AGGACCCTGC ACCTGGATGG GGGTCCCTGT GGGTCAAATT  
 3951 GGGGGGAGGT GCTGTGGGAG TAAATACTG AATATATGAG TTTTTCAGTT  
 4001 TTGAAAAAAA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA

Figur 72

[illegible]

Figur 72 (Fortsetzung)

[illegible]



Figur 72 (Fortsetzung)

TGGAGGAGTACAGCTGGTTTCTGTGTGTGTGACCTGCGACAGCCGCGGAGAGGCCAG  
 841 ----- 900  
 AGCTGGTCTACTATACCAAGACACACACAGCTGACGGTCTGCGGCGCTTTTTCGCTG

A W T E \* P W F L C G V T C Q T R R R S H -  
 D G P S D R G F C V V S P A R P A E E A T  
 C D R V T V V S V W C H L P D P F K K P F -

CTCCTTCTAGGCTTGGCTCTCTGTGGACGGCGCACTCCACCCATGCTGGGGGTGGAGCA  
 901 ----- 960  
 CACAAAGCTCCACCGGAGAGACCTTACGCTGACGGTGGGTAGCCACCCGCGCGCTCT

A L F C G C A L W H A P L P P I R G F F A  
 D S L E G A L S C T K H S H P S V G R Q H -  
 C L W R V R S L A R A T P T H P W A A S T -

CCGCGGGGGCGGATATACATGCGCGCCACCACTCTTCGACACGCTTTCTTCCCTGG  
 961 ----- 1020  
 GATTGCGCGCGGCGCTAGGTGTAGCGCGGTGTGTGAGGAAGCTGTGCGGAGACAGGCGC

A P R C P P I H I A A T T S W D T F C P P  
 D H A G P P S T S R P P R P G T R L V P R  
 C T R A P H P H R G K H V L G H A L S P C -

GTGTAGCGGAGACCAAGCACTTCTCTACTCTCTAGCGGAGAGAGCACTTCTGCGCTT  
 1021 ----- 1080  
 CACATPAGGCTTCTTCTTCTTACGAGATAGGAGTCTGCTCTTCTTCTGACGCGCGAG

A V Y A E T K H F L Y S S C D K ? T A ? L -  
 D C T P R P S T S S T P Q A T ? T L R P S -  
 C V E R D Q A L F L L L R R Q ? H C ? P P -

CTTCTACTCTATATATCTGAGCGCCAGCTTACTTGGCGTTGCGGAGTTTCTGTGAGACA  
 1081 ----- 1140  
 GAGCGATCGCTTATATAGACTTCCGCTTGGACATGACCGCAAGTCTCTCAAGCACTTCTT

A L P T Q Y I \* G P A \* L A F G K F V E T  
 D F L L H I S E A Q P D W R S C G S W R Y -  
 C S Y S I Y L R P S L T G V R E V K G D ? -

ATCTTCTCTTCTTACGCGCTTGGATGCAATTCGCGGAGGTTTGGCGCGCTTGGCGCA  
 1141 ----- 1200  
 NAGAGAGCTCAAGTCTCTGAGCTTACTGCTCTTACGGCGCTTCAAGCGCGCTTACCGGAT

A P F L V P G L G C Q D S P Q V A P P A P -  
 D S T W F Q A L D A R I P R R L P R L P Q -  
 C L S G S R P W M P G F P A G C P A C P S -

GCGNTACTGCAATTCGCGCGCTTCTTCTGAGCTCTTCTGAGCAAGCTTCTGAGCTTCT  
 1201 ----- 1260  
 GCGNATACCTTCTAGCTCGCGGAGCAAGACTTCCAGCAAGCTTCTGAGCTTCTGAGCTT

A A \* L A N A A P V S G A A W E P R A V P -  
 D R Y W Q M R F L F L E L L G N H A Q C P -  
 C P T G K C G Y C P W S C L C T T K S A P -

[illegible]

	TCTGTACTGGTTCGAGTTGTGTATGCTGTCTCAGCTCTCTTTATTCTA	
1891	-----	1740
A	AGGAAGTGACCGACTACTTCACACATCCAGCAAGTTGAGGANTGCAGAAATAAATACAGT	
S	E C T G * V C T S S S C S C L S F H S -	
D	P A L A D E C V K R R A A Q V F L L C H -	
C	L H W I L H S V Y V V E L L R S F F Y V T -	
	CGAGAACCAOFTTTCAAAAGAACAGGCTCTTTTTCTACCGGAAGAGTGTCTCGAGCAANT	
1741	-----	1800
A	GCTCTGGTTCGAAAGCTTTCTTTCTGCGAGAAAAAGATGCCCTTCTCACAGAGCTCTTCTA	
S	R K P S F K R T G S F S T G R V S G A S -	
D	G D H V S K E Q A L F L P E E C L E Q V -	
C	E T T F Q K N R L F F Y R K S V W S K L -	
	TCCAAAGCATTTGAATCAGACAGCACTTGAAAGAGGCTGCCAGCTTCCGGGAGCTGTCTGTAAG	
1801	-----	1860
A	AGCTTTGNTAACCTTAGTCTGTCTGTAAGCTTTCTCCACAGTGCAGCCCTTCACAGAGCTTC	
S	C K A L E S D S T * K C C S C G S C R K -	
D	A K H W N O T A L E E C A A A C A V C S -	
C	Q S T G T R Q H L K R V Q L R E L S E A -	
	CAGAATTCAGGACGATTCGGAAGCCAGCCCCGCTCTCTACCTCCAGACTTCGCTTCA	
1861	-----	1920
A	GTCTGCACTGCTGTATAGCCCTTGGSTGCGGCGCGCAGCACTGCAGCTTCTCAAGTCAANT	
S	Q R E G S I G K P C P P C * R F D S A S -	
D	K C Q A A S C S O A R P A D V G T F L H -	
C	S V S Q H R E A P P A L L T S R L R F I -	
	TCCCCAGCCTTACCGGCTSCCGGCGCATTTGTRACATGCACTACTCTCTGGGAGCCAGPA	
1921	-----	1980
A	AGAGGTTGCACTTCGCGAGCGGCACTTACACTTNTTCCGTATGCAGCAAGCTTGGTUTT	
S	S P F L T G C G R L * T W T T S W E F E -	
D	P Q A * R A A A D C E H G L R R C S Q N -	
C	F R P D G L R P I V N M D Y V V G A N T	
	CTTTTCCGACAGAAAGAGGCCCCAGCCCTCTACCTTCAGCGGTGAAGRTACTTCTTCAAGS	
1981	-----	2040
A	GCAAGGNTTCTTTTTCTCCCGGCTGTCAGAGTGCAGCTTCCCACTTTCGTCACAGTCCC	
S	R S A E K R C P S V S P K C * R H C S A -	
D	V F Q R K E G R A S H L E G E C T V Q R -	
C	F S R E K R A E R L T S R V K A L F S U -	
	TGCTCACTAGCAAGGCGGCGGCGGCGGCGGCTTCTTCCGCGCTTCTTCTGCTGCTGCTG	
2041	-----	2100
A	ACGAGTTNTTCTTCCCG	
S	C S T T S C R G A P A S W A P L C W A W -	
D	A Q L R A G A A P R P C G R L C A G F C -	
C	L N T E E A S E P G L L G A S V L G L D -	

Figur 72 (Fortsetzung)

ACGATATCCAGCAGCGCTGTGCCCACTTGTATTTCGGTTTAAAGGAGAGCGCGCGCG

2101 ----- 2160  
TGCTATAAGGTGTCCGCAGCGCGCTGTGAAGCAGCAGCGTACAGCGCGCGCTGTCTCGCGCGCG

A T I S T C P G A P S C C U C O P R E R -  
R Y F Q Q L A H L R A A C A C P G F A A -  
C D I H R A W R T F V L R V R A Q O P F F -

CITAGCTGTACTTTTCTCAAAGTGTATGTGAGCGCGCGCTTACGACAGCGCTTCCCCAGGAGA

2161 ----- 2220  
GACTCGACATGAAACAGCTTCCAGCTACAGTGGCGCGGPATGCTGTGTGTAGCGCGCTGTCT

L S C T L S R W M \* R A R T T F S P R T -  
\* A V L C Q G G C D G R V R H H P G Q -  
E L Y F V K V D V T C A Y D T I P Q D N -

GCTTCACTAGGTTCATGCCAGCATCATCAAGCCCGAGAACACGTA CTGCGTCTGTCGCT

2221 ----- 2280  
CGCACTGCTTCCAGTAGCGGTGCTAGTAGTTTGGGTUTTGTGCATGACCGAGCGAGGGA

G E R R S S P A S S N P R T R T A C V G -  
A H G C H R Q H H Q T P E H V L R A S V -  
L T E V I A S I I K P Q N T Y C V R R Y -

ATGCGTGTGTCAGCAGCGCTGTGTCAGCTTCCAGCGCTTCCAGCGCTTCCAGCGCTTCCAGCGCT

2281 ----- 2340  
TACCGCACCGAGTCTTTCGCGCGCTTCCCGTTCAGCGCTTCCAGCGCTTCCAGCGCTTCCAGCGCT

H P W S R R P P H G T S A R P S R A T S -  
C R C P E C R P W A R P Q Q L Q E P R L -  
A V V Q K A A H G H V R K A F H S H V E

CTGCTTACAGAGCTTCCAGCGCTTCCAGCTTCCAGCTTCCAGCTTCCAGCTTCCAGCTTCCAGCTTCCAGCT

2341 ----- 2400  
GATGAACTGTCTGCGAGTTCGCGCTTCCAGCTTCCAGCTTCCAGCTTCCAGCTTCCAGCTTCCAGCTTCCAGCT

L P \* Q T S S R T C D S S W L T C R T -  
Y L D R P F A V H A T V R G S P A G ? Q -  
T L T D L Q P Y M R O F V A H L Q / N S -

GCGCTTCAAGCAGCTTCCAGCTTCCAGCTTCCAGCTTCCAGCTTCCAGCTTCCAGCTTCCAGCTTCCAGCT

2401 ----- 2460  
CGCGCGAGTCTTCCAGCTTCCAGCTTCCAGCTTCCAGCTTCCAGCTTCCAGCTTCCAGCTTCCAGCTTCCAGCT

A R \* G M P S S S S R A P P \* M R P A V -  
P A E G C R R H R A E L L P E \* G Q Q W -  
F L R D A V V I E Q S S S L N E A S S G -

GCTTCTTCCAGCTTCTTCCAGCTTCCAGCTTCCAGCTTCCAGCTTCCAGCTTCCAGCTTCCAGCTTCCAGCT

2461 ----- 2520  
CGGAGTACCTTCCAGCTTCCAGCTTCCAGCTTCCAGCTTCCAGCTTCCAGCTTCCAGCTTCCAGCTTCCAGCT

A S S T S S Y A S C A T T P C A S G A S -  
P L R R L P T L H V P P R R A H Q G O V -  
L Y D V F L R F H C H H A V R I R G K S -

[illegible]

2941	-----	3000
A	S R L G G T C V A N S L G E C Q * S V T	
D	Q Q W E E H A S Q T L W C L A A E V S Q	
C	K A G R N M R R X I F G V I R I K C H S	
3001	-----	3060
A	A C F W I C R * T A S K K C A F T S T K	
D	P V S C F A G E Q P P D G V H Q H L Q D	
C	L F L D L Q V N S L Q T V C T N I Y K T	
3061	-----	3120
A	S S C C R R T G F T H V C C E S H F L S	
D	T F A A G V Q V S R M C A A A P I S S A	
C	L L L Q A Y R F H A C V L O L P Y H Q Q	
3121	-----	3180
A	K F G R T P H F S C A S S L T R F F S A	
D	S L E E P H I F P A R H L * H G L P L L	
C	V W K N P T F F L R V I S D T A S L C Y	
3181	-----	3240
A	T P S * K F R T Q G C R W G P R A F P A	
D	L H F E S Q E R R P D V A G G Q G R R R P	
C	S I L K A E N A C H S L C A N C A A C F	
3241	-----	3300
A	L C P P P P C S G C A T E H S C S * L	
D	S A I R G R A V A V P P S I P A Q A D S	
C	L P S E A V Q W L C H Q A F L L K L T R	
3301	-----	3360
A	D T V S P T C H S W G H S G Q F R D S *	
D	T P C H L R A T P G V T Q D S P D A A E	
C	H S V T T V F L L G S L E T A Q T Q L S	

Figur 72 (Fortsetzung)

3361 ----- 3420  
 CACCGCTTCGAGGGGGCTCTGCTGGAGCTGACGGACCTCCCGCTCTGGTTTGGAGCTGAGCT  
 V G E S R G R R \* L F W R P Q F T R H C -  
 E E A P G D D A D C P G G R E Q P G T A -  
 R K L P G T T L T A L E A A A N Y A L F -  
 3421 ----- 3480  
 GGAGTGTGAGTTCTGTGTAGGACCTGACTACGGGTGGXGGTGTGTGTGCTGGCTGTCTCT  
 P Q T S R P S W T D G H F P T A P P R A -  
 L E L Q D H P G L M A T E P Q P G R E Q -  
 S D P K T I L D \* W P F A H S Q A E S R -  
 3481 ----- 3540  
 CTGTATGCTGCGGACACTGCGCGCTGAGATGACGGGTGCTCTGCTGCGCGCGGTGTTG  
 D T S S P V T P G S T S Q G C K G G P H -  
 T P A A L S R R A L K P R E G G A A H T -  
 H Q Q P C H A G L Y V P G R E G E F T P -  
 3541 ----- 3600  
 GTTTCGGGCTGGGACCTGACACTCGGACTCACTACAAACGGGCTGGACAGTACA  
 P G P H R W E S E A \* V S V W P R P A C -  
 Q A R T A G S L S P E \* V F C R G L H V -  
 R P A P L G V \* G L S E C L A E A C M S -  
 3601 ----- 3660  
 GGGGTGAAGGCTGAGTGTCTGGCTGAGGCTGAGGAGTGTGTACCCAAAGGCTGAGTC  
 GGGTCACTTGTGACTGACAGGCTCACTCGGACTGCTGACAGGTGCTTTCGGACTTAC  
 P A E G \* V S G \* G L S E C F A K C \* V -  
 R L F A E C P A L A \* A S V Q P R A E C -  
 G \* R L S V R L R P E R V S S Q G L S V -  
 3661 ----- 3720  
 TGCAGGACAGCTTGGCTCTTCACTTGGCCACAGCTTGGCTTGGCTTCCAGCTGAGGGG  
 AGTGTGTGTGACGGGAGAACTGAAAGGCTGTGCGAGCTGAGGCTGAGGTGAGGTGAGG  
 S E T P A V F T S P Q A G A R C H P K A -  
 P A H L P S S L P H R L A L G S T P G P -  
 Q H T C E L H F P T G W E S A P P Q G Q -  
 3721 ----- 3780  
 AGCTTTTCTACCGGAGCGCGGCTTCACTTGGCCATAGCAATAGTTCATTCGGGAGA  
 TGGAGAGGAGTGTGTCTTGGGCGAGGCTGAGGGGTGTAAGCTTATCAAGTACGGCTCT  
 S F S S P G A R L P L P T \* E \* E T P R -  
 A P P H Q E P G F H S P H R N S P S P S -  
 L F L T R S P A S T P H I G I V H F Q T -

Figur 72 (Fortsetzung)

```

3781 ----- 3840
TTCGGCATTTTACACCGCTGACCTGCTGCTTTTGGCTTCACCGCCGACGACGAGTTC
AACGCTAACACATGTCGGACCTGGCAAGCCGCAAAACGTAAGCTGAGGTGCTGAGCTCCAC

A   F A I V H P S P C P P L P S T P T I Q V -
B   S I L F T P R P A L L C L P P P P P R W -
C   P H C S P L A L P S P A F R P H H P G G -

GAGACCTTCGAAAGACCTTGGGAGTTCGGAATTTCAGTTCAGTTCAGTTCAGTTCAGTTC
3841 ----- 3900
CTCTGAACTCTTCTCGGACCTTCGACAGCTTAAAGCTCACTGCTTTTCAGCAAGGACAC
A   E T L H S T L G A L G I W S Q Q R C A L -
B   P P * E Q P W E I W E F G V T K G V P C -
C   D P E K D F G S S C N L E * P K V C P V -

TACACAGCGGACGACCGCTGACCTGCAATGCGGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCT
3901 ----- 3960
ATGCTGTCGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCT
A   Y T G E D P A P G W G S Q W V K L G G C -
B   T Q A R T L H L D G G P C G S N W G R V -
C   H R S C P C T W H C V P V C Q I G G K C

GCTGTCGAGTAAATATCTGAAATATATGAGTTCCTGCTTTTAAAAAAGAAAAAAGAAA
3961 ----- 4020
CGACAGCTGCTATTTTATGAGTTATATACTGAAAAGTCAAAAATTTTTTTTTTTTTTTT
A   A V G V K Y * I Y E F F S P E K K K K K
B   L W E * N T E Y M S F S V L K K K K K
C   C G S K T L N I * V F Q F * K K K K K K -

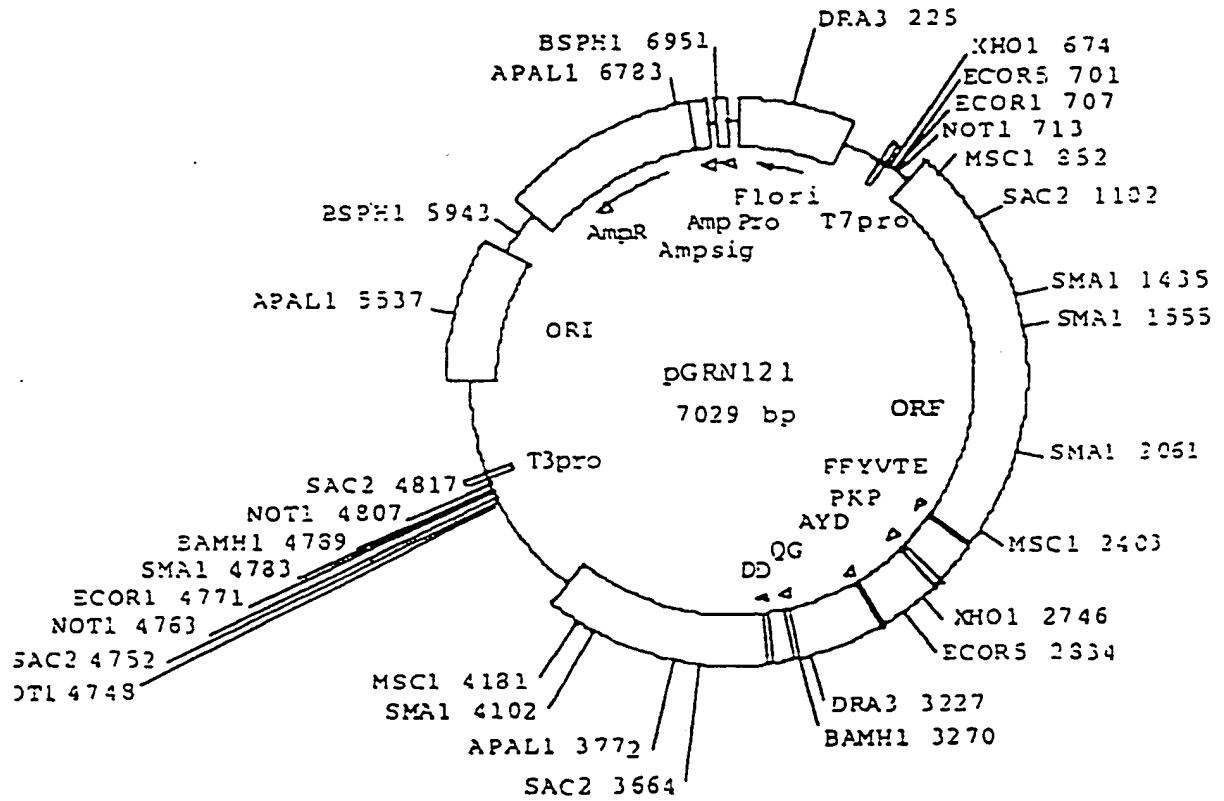
AAAAA
4021 ----- 4029
TTTTTTT

A   K K K -
B   K K -
C   K K -

```



Figur 73



Figur 74

GCAGCGCTGCGTCCTGCTGCGCACGTGGGAAGCCCTGGCCCCGGCCACCCCCGCG ATG met  
 10  
 pro arg ala pro arg cys arg ala val arg ser leu leu arg ser  
 CCG CGC GCT CCC CGC TGC CGA GCC GTG CGC TCC CTG CTG CGC AGC  
 20  
 his tyr arg glu val leu pro leu ala thr phe val arg arg leu  
 CAC TAC CGC GAG GTG CTG CCG CTG GCC ACG TTC GTG CGG CGC CTG  
 30  
 40  
 gly pro gln gly trp arg leu val gln arg gly asp pro ala ala  
 GGG CCC CAG GGC TGG CCG CTG GTG CAG CGC GGG GAC CCG GCG GCT  
 50  
 phe arg ala leu val ala gln cys leu val cys val pro trp asp  
 TTC CGC GCG CTG GTG GCC CAG TGC CTG GTG TGC GTG CCC TGG GAC  
 60  
 70  
 ala arg pro pro pro ala ala pro ser phe arg gln val ser cys  
 GCA CGG CCG CCC CCC GCC GCC CCC TCC TTC CGC CAG GTG TCC TGC  
 80  
 leu lys glu leu val ala arg val leu gln arg leu cys glu arg  
 CTG AAG GAG CTG GTG GCC CGA GTG CTG CAG AGG CTG TGC GAG CGC  
 90  
 100  
 gly ala lys asn val leu ala phe gly phe ala leu leu asp gly  
 GGC GCG AAG AAC GTG CTG GCC TTC GGC TTC GCG CTG CTG GAC GGG  
 110  
 ala arg gly gly pro pro glu ala phe thr thr ser val arg ser  
 GCC CGC GGG GGC CCC CCC GAG GCC TTC ACC ACC AGC GTG CGC AGC  
 120  
 130  
 tyr leu pro asn thr val thr asp ala leu arg gly ser gly ala  
 TAC CTG CCC AAC ACG GTG ACC GAC GCA CTG CGG GGG AGC GGG GCG

Figur 74 (Fortsetzung)

												140													150
trp	gly	leu	leu	leu	arg	arg	val	gly	asp	asp	val	leu	val	his											
TGG	GGG	CTG	CTG	CTG	CGC	CGC	GTG	GGC	GAC	GAC	GTG	CTG	GTT	CAC											
												160													
leu	leu	ala	arg	cys	ala	leu	phe	val	leu	val	ala	pro	ser	cys											
CTG	CTG	GCA	CGC	TGC	GCG	CTG	TTT	GTG	CTG	GTG	GCT	CCC	AGC	TGC											
												170													180
ala	tyr	gln	val	cys	gly	pro	pro	leu	tyr	gln	leu	gly	ala	ala											
GCC	TAC	CAG	GTG	TGC	GGG	CCG	CCG	CTG	TAC	CAG	CTC	GGC	GCT	GCC											
												190													
thr	gln	ala	arg	pro	pro	pro	his	ala	ser	gly	pro	arg	arg	arg											
ACT	CAG	GCC	CGG	CCC	CCG	CCA	CAC	GCT	AGT	GGA	CCC	CGA	AGG	CGT											
												200													210
leu	gly	cys	glu	arg	ala	trp	asn	his	ser	val	arg	glu	ala	gly											
CTG	GGA	TGC	GAA	CGG	GCC	TGG	AAC	CAT	AGC	GTC	AGG	GAG	GCC	GGG											
												220													
val	pro	leu	gly	leu	pro	ala	pro	gly	ala	arg	arg	arg	gly	gly											
GTC	CCC	CTG	GGC	CTG	CCA	GCC	CCG	GGT	GCG	AGG	AGG	CGC	GGG	GGC											
												230													240
ser	ala	ser	arg	ser	leu	pro	leu	pro	lys	arg	pro	arg	arg	gly											
AGT	GCC	AGC	CGA	AGT	CTG	CCG	TTG	CCC	AAG	AGG	CCC	AGG	CGT	GGC											
												250													
ala	ala	pro	glu	pro	glu	arg	thr	pro	val	gly	gln	gly	ser	trp											
GCT	GCC	CCT	GAG	CCG	GAG	CGG	ACG	CCC	GTT	GGG	CAG	GGG	TCC	TGG											
												260													270
ala	his	pro	gly	arg	thr	arg	gly	pro	ser	asp	arg	gly	phe	cys											
GCC	CAC	CCG	GGC	AGG	ACG	CGT	GGA	CCG	AGT	GAC	CGT	GGT	TTC	TGT											
												280													
val	val	ser	pro	ala	arg	pro	ala	glu	glu	ala	thr	ser	leu	glu											
GTG	GTG	TCA	CCT	GCC	AGA	CCC	GCC	GAA	GAA	GCC	ACC	TCT	TTG	GAG											

Figur 74 (Fortsetzung)

290												300		
gly	ala	leu	ser	gly	thr	arg	his	ser	his	pro	ser	val	gly	arg
GGT	GCG	CTC	TCT	GGC	ACG	CGC	CAC	TCC	CAC	CCA	TCC	GTG	GGC	CGC
310														
gln	his	his	ala	gly	pro	pro	ser	thr	ser	arg	pro	pro	arg	pro
CAG	CAC	CAC	GCG	GGC	CCC	CCA	TCC	ACA	TCG	CGG	CCA	CCA	CGT	CCC
320												330		
trp	asp	thr	pro	cys	pro	pro	val	tyr	ala	glu	thr	lys	his	phe
TGG	GAC	ACG	CCT	TGT	CCC	CCG	GTG	TAC	GCC	GAG	ACC	AAG	CAC	TTC
340														
leu	tyr	ser	ser	gly	asp	lys	glu	gln	leu	arg	pro	ser	phe	leu
CTC	TAC	TCC	TCA	GGC	GAC	AAG	GAG	CAG	CTG	CGG	CCC	TCC	TTC	CTA
350												360		
leu	ser	ser	leu	arg	pro	ser	leu	thr	gly	ala	arg	arg	leu	val
CTC	AGC	TCT	CTG	AGG	CCC	AGC	CTG	ACT	GGC	GCT	CGG	AGG	CTC	GTG
370														
glu	thr	ile	phe	leu	gly	ser	arg	pro	trp	met	pro	gly	thr	pro
GAG	ACC	ATC	TTT	CTG	GGT	TCC	AGG	CCC	TGG	ATG	CCA	GGG	ACT	CCC
380												390		
arg	arg	leu	pro	arg	leu	pro	gln	arg	tyr	trp	gln	met	arg	pro
CGC	AGG	TTG	CCC	CGC	CTG	CCC	CAG	CGC	TAC	TGG	CAA	ATG	CGG	CCC
400														
leu	phe	leu	glu	leu	leu	gly	asn	his	ala	gln	cys	pro	tyr	gly
CTG	TTT	CTG	GAG	CTG	CTT	GGG	AAC	CAC	GCG	CAG	TGC	CCC	TAC	GGG
410												420		
val	leu	leu	lys	thr	his	cys	pro	leu	arg	ala	ala	val	thr	pro
GTG	CTC	CTC	AAG	ACG	CAC	TGC	CCG	CTG	CGA	GCT	GCG	GTC	ACC	CCA
430														
ala	ala	gly	val	cys	ala	arg	glu	lys	pro	gln	gly	ser	val	ala
GCA	GCC	GGT	GTC	TGT	GCC	CGG	GAG	AAG	CCC	CAG	GGC	TCT	GTG	GCG

440														450	
ala	pro	glu	glu	glu	asp	thr	asp	pro	arg	arg	leu	val	gln	leu	
GCC	CCC	GAG	GAG	GAG	GAC	ACA	GAC	CCC	CGT	CGC	CTG	GTG	CAG	CTG	
460															
leu	arg	gln	his	ser	ser	pro	trp	gln	val	tyr	gly	phe	val	arg	
CTC	CGC	CAG	CAC	AGC	AGC	CCC	TGG	CAG	GTG	TAC	GGC	TTC	GTG	CGG	
470														480	
ala	cys	leu	arg	arg	leu	val	pro	pro	gly	leu	trp	gly	ser	arg	
GCC	TGC	CTG	CGC	CGG	CTG	GTG	CCC	CCA	GGC	CTC	TGG	GGC	TCC	AGG	
490															
his	asn	glu	arg	arg	phe	leu	arg	asn	thr	lys	lys	phe	ile	ser	
CAC	AAC	GAA	CGC	CGC	TTC	CTC	AGG	AAC	ACC	AAG	AAG	TTC	ATC	TCC	
500														510	
leu	gly	lys	his	ala	lys	leu	ser	leu	gln	glu	leu	thr	trp	lys	
CTG	GGG	AAG	CAT	GCC	AAG	CTC	TCG	CTG	CAG	GAG	CTG	ACG	TGG	AAG	
520															
met	ser	val	arg	asp	cys	ala	trp	leu	arg	arg	ser	pro	gly	val	
ATG	AGC	GTG	CGG	GAC	TGC	GCT	TGG	CTG	CGC	AGG	AGC	CCA	GGG	GTT	
530														540	
gly	cys	val	pro	ala	ala	glu	his	arg	leu	arg	glu	glu	ile	leu	
GGC	TGT	GTT	CCG	GCC	GCA	GAG	CAC	CGT	CTG	CGT	GAG	GAG	ATC	CTG	
550															
ala	lys	phe	leu	his	trp	leu	met	ser	val	tyr	val	val	glu	leu	
GCC	AAG	TTC	CTG	CAC	TGG	CTG	ATG	AGT	GTG	TAC	GTC	GTC	GAG	CTG	
560														570	
leu	arg	ser	phe	phe	tyr	val	thr	glu	thr	thr	phe	gln	lys	asn	
CTC	AGG	TCT	TTC	TTT	TAT	GTC	ACG	GAG	ACC	ACG	TTT	CAA	AAG	AAC	
580															
arg	leu	phe	phe	tyr	arg	pro	ser	val	trp	ser	lys	leu	gln	ser	
AGG	CTC	TTT	TTC	TAC	CGG	CCG	AGT	GTC	TGG	AGC	AAG	TTG	CAA	AGC	
590														600	
ile	gly	ile	arg	gln	his	leu	lys	arg	val	gln	leu	arg	glu	leu	
ATT	GGA	ATC	AGA	CAG	CAC	TTG	AAG	AGG	GTG	CAG	CTG	CGG	GAG	CTG	

Figur 74 (Fortsetzung)

														610															
ser	glu	ala	glu	val	arg	gln	his	arg	glu	ala	arg	pro	ala	leu															
TCG	GAA	GCA	GAG	GTC	AGG	CAG	CAT	CGG	GAA	GCC	AGG	CCC	GCC	CTG															
														620															630
leu	thr	ser	arg	leu	arg	phe	ile	pro	lys	pro	asp	gly	leu	arg															
CTG	ACG	TCC	AGA	CTC	CGC	TTC	ATC	CCC	AAG	CCT	GAC	GGG	CTG	CGG															
														640															
pro	ile	val	asn	met	asp	tyr	val	val	gly	ala	arg	thr	phe	arg															
CCG	ATT	GTG	AAC	ATG	GAC	TAC	GTC	GTG	GGA	GCC	AGA	ACG	TTC	CGC															
														650															660
arg	glu	lys	arg	ala	glu	arg	leu	thr	ser	arg	val	lys	ala	leu															
AGA	GAA	AAG	AGG	GCC	GAG	CGT	CTC	ACC	TCG	AGG	GTG	AAG	GCA	CTG															
														670															
phe	ser	val	leu	asn	tyr	glu	arg	ala	arg	arg	pro	gly	leu	leu															
TTC	AGC	GTG	CTC	AAC	TAC	GAG	CGG	GCG	CGG	CGC	CCC	GGC	CTC	CTG															
														680															690
gly	ala	ser	val	leu	gly	leu	asp	asp	ile	his	arg	ala	trp	arg															
GGC	GCC	TCT	GTG	CTG	GGC	CTG	CAC	GAT	ATC	CAC	AGG	GCC	TGG	CGC															
														700															
thr	phe	val	leu	arg	val	arg	ala	gln	asp	pro	pro	pro	glu	leu															
ACC	TTC	GTG	CTG	CGT	GTG	CGG	GCC	CAG	GAC	CCG	CCG	CCT	GAG	CTG															
														710															720
tyr	phe	val	lys	val	asp	val	thr	gly	ala	tyr	asp	thr	ile	pro															
TAC	TTT	GTC	AAG	GTG	GAT	GTG	ACG	GGC	GCG	TAC	GAC	ACC	ATC	CCC															
														730															
gln	asp	arg	leu	thr	glu	val	ile	ala	ser	ile	ile	lys	pro	gln															
CAG	GAC	AGG	CTC	ACG	GAG	GTC	ATC	GCC	AGC	ATC	ATC	AAA	CCC	CAG															
														740															750
asn	thr	tyr	cys	val	arg	arg	tyr	ala	val	val	gln	lys	ala	ala															
AAC	ACG	TAC	TGC	GTG	CGT	CGG	TAT	GCC	GTG	GTC	CAG	AAG	GCC	GCC															
														760															
his	gly	his	val	arg	lys	ala	phe	lys	ser	his	val	ser	thr	leu															
CAT	GGG	CAC	GTC	CGC	AAG	GCC	TTC	AAG	AGC	CAC	GTC	TCT	ACC	TTC															

Figur 74(Fortsetzung)

770	780
thr asp leu gln pro tyr met arg gln phe val ala his leu gln	
ACA GAC CTC CAG CCG TAC ATG CGA CAG TTC GTG GCT CAC CTC CAG	
790	
glu thr ser pro leu arg asp ala val val ile glu gln ser ser	
GAG ACC AGC CCG CTG AGG GAT GCC GTC GTC ATC GAG CAG AGC TCC	
800	810
ser leu asn glu ala ser ser gly leu phe asp val phe leu arg	
TCC CTG AAT GAG GCC AGC AGT GGC CTC TTC GAC GTC TTC CTA CGC	
820	
phe met cys his his ala val arg ile arg gly lys ser tyr val	
TTC ATG TGC CAC CAC GCC GTG CGC ATC AGG GGC AAG TCC TAC GTC	
830	840
gln cys gln gly ile pro gln gly ser ile leu ser thr leu leu	
CAG TGC CAG GGG ATC CCG CAG GGC TCC ATC CTC TCC ACG CTG CTC	
850	
cys ser leu cys tyr gly asp met glu asn lys leu phe ala gly	
TGC AGC CTG TGC TAC GGC GAC ATG GAG AAC AAG CTG TTT GCG GGG	
860	870
ile arg arg asp gly leu leu leu arg leu val asp asp phe leu	
ATT CCG CCG GAC GGG CTG CTC CTG CGT TTG GTG GAT GAT TTC TTG	
880	
leu val thr pro his leu thr his ala lys thr phe leu arg thr	
TTG GTG ACA CCT CAC CTC ACC CAC GCG AAA ACC TTC CTC AGG ACC	
890	900
leu val arg gly val pro glu tyr gly cys val val asn leu arg	
CTG GTC CGA GGT GTC CCT GAG TAT GGC TGC GTG GTG AAC TTG CGG	
910	
lys thr val val asn phe pro val glu asp glu ala leu gly gly	
AAG ACA GTG GTG AAC TTC CCT GTA GAA GAC GAG GCC CTG GGT GGC	
920	930
thr ala phe val gln met pro ala his gly leu phe pro trp cys	
ACG GCT TTT GTT CAG ATG CCG GCC CAC GGC CTA TTC CCC TGG TGC	

Figur 74 (Fortsetzung)

940  
 gly leu leu leu asp thr arg thr leu glu val gln ser asp tyr  
 GGC CTG CTG CTG GAT ACC CGG ACC CTG GAG GTG CAG AGC GAC TAC

950 960  
 ser ser tyr ala arg thr ser ile arg ala ser val thr phe asn  
 TCC AGC TAT GCC CGG ACC TCC ATC AGA GCC AGT GTC ACC TTC AAC

970  
 arg gly phe lys ala gly arg asn met arg arg lys leu phe gly  
 CGC GGC TTC AAG GCT GGG AGG AAC ATG CGT CGC AAA CTC TTT GGG

980 990  
 val leu arg leu lys cys his ser leu phe leu asp leu gln val  
 GTC TTG CGG CTG AAG TGT CAC AGC CTG TTT CTG GAT TTG CAG GTG

1000  
 asn ser leu gln thr val cys thr asn ile tyr lys ile leu leu  
 AAC AGC CTC CAG ACG GTG TGC ACC AAC ATC TAC AAG ATC CTC CTG

1010 1020  
 leu gln ala tyr arg phe his ala cys val leu gln leu pro phe  
 CTG CAG GCG TAC AGG TTT CAC GCA TGT GTG CTG CAG CTC CCA TTT

1030  
 his gln gln val trp lys asn pro thr phe phe leu arg val ile  
 CAT CAG CAA GTT TGG AAG AAC CCC ACA TTT TTC CTG CGC GTC ATC

1040 1050  
 ser asp thr ala ser leu cys tyr ser ile leu lys ala lys asn  
 TCT GAC ACG GCC TCC CTC TGC TAC TCC ATC CTG AAA GCC AAG AAC

1060  
 ala gly met ser leu gly ala lys gly ala ala gly pro leu pro  
 GCA GGG ATG TCG CTG GCG GCC AAG CGC GCC GCC GGC CCT CTG CCC

1070 1080  
 ser glu ala val gln trp leu cys his gln ala phe leu leu lys  
 TCC GAG GCC GTG CAG TGG CTG TGC CAC CAA GCA TTC CTG CTC AAG

1090  
 leu thr arg his arg val thr tyr val pro leu leu gly ser leu  
 CTG ACT CGA CAC CGT GTC ACC TAC GTG CCA CTC CTG GGG TCA CTC



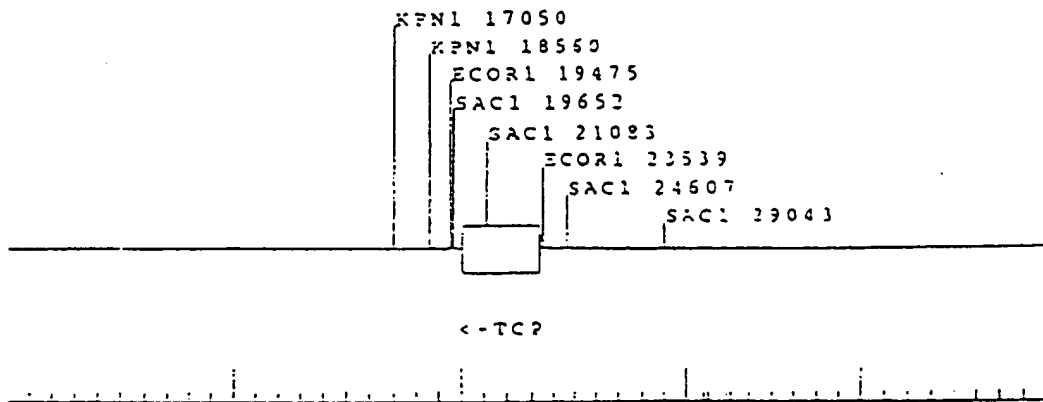
Figure 74 (Fortsetzung)

1100 1110  
 arg thr ala gln thr gln leu ser arg lys leu pro gly thr thr  
 AGG ACA GCC CAG ACG CAG CTG AGT CGG AAG CTC CCG GGG ACG ACG

1120  
 leu thr ala leu glu ala ala ala asn pro ala leu pro ser asp  
 CTG ACT GCC CTG GAG GCC GCA GCC AAC CCG GCA CTG CCC TCA GAC

1130 1132  
 phe lys thr ile leu asp OP  
 TTC AAG ACC ATC CTG GAC TGA TGGCCACCCGCCACAGCCAGGCCGAGAGCAGA  
 CACCAGCAGCCCTGTCACGCCGGGCTCTACGTCCCAGGGAGGGAGGGCGGCCACACCC  
 AGGCCCGCACCGCTGGGAGTCTGAGGCCTGAGTGAGTGTTTGGCCGAGGCCTGCATGTCC  
 GGCTGAAGCCTGAGTGTCGGCTGAGGCCTGAGCGAGTGTCAGCCAAGGGCTGAGTGTC  
 CAGCACACCTGCCGTCTTCACTTCCCCACAGGCTGGCGCTCGGCTCCACCCCAGGGCCAG  
 CTTTTCYTCACCAGGAGCCCGGCTTCCACTCCCCACATAGGAATAGTCCATCCCCAGATT  
 CGCCATTGTTACCCCYTCGCCCTGCCYTCCTTTGCCTTCCACCCCCACCATCCAGGTGGA  
 GACCCTGAGAAGGACCCTGGGAGCTCTGGGAATTTGGAGTGACCAAAGGTGTGCCCTGTA  
 CACAGGCGAGGACCCTGCACCTGGATGGGGGTCCCTGTGGGTCAAATGGGGGGAGGTGC  
 TGTGGGAGTAAAATACTGAATATATGAGTTTTTTCAGTTTTTGRAAAAAAAAAAAAAAAAA  
 AAAAAAAAAA

Figur 75



## FIGUR 76

Seite 1

KARTE DER RESTRIKTIONS-STELLEN UND BEREICHE VON DNA  
pGRN144.4

```

3601 ATCGATTGGGCCCCGAGATCTCGCGCGCGAGGCCTGCCATGGGACCCACTGCAGGGGCAGC
    TAGCTAACCCGGGCTCTAGAGCGCGCGCTCCGGACGGTACCCTGGGTGACGTCCCCGTCTG
          ^                               ^
          3615                           3636
          BGL2                           NCO1

3661 TGGGANGCTGCAGGCTTCAGGTCCCAGTGGGGTTGCCATCTGCCAGTAGAAACCTGATGT
    ACCCTNCGACGTCCGAAGTCCAGGGTCACCCCAACGGTAGACGGTCATCTTTGGACTACA

3721 AGAATCAGGGCGCGAGTGTGGACACTGTCCTGAATCTCAATGTCTCAGTGTGTGCTGAAA
    TCTTAGTCCCGCGCTCACACCTGTGACAGGACTTAGAGTTACAGAGTCACACACGACTTT

3781 CATGTAGAAATTAAAGTCCATCCCTCCTACTCTACTGGGATTGAGCCCCTTCCCTATCCC
    GTACATCTTTAATTTAGGTAGGGAGGATGAGATGACCCTAACTCGGGGAAGGGATAGGG

3841 CCCCCAGGGGCAGAGGAGTTCCTCTCACTCCTGTGGAGGAAGGAATGATACTTTGTTATT
    GGGGGTCCCCGTCTCCTCAAGGAGAGTGAGGACACCTCCTTCCTTACTATGAAACAATAA

                                     *****
3901 TTTCAGTCTGGTACTGAATCCACTGTTTCATTTGTTGGTTTGTGTTTGTGTTTGTGTTTGA
    AAAGTGACGACCATGACTTAGGTGACAAAGTAAACAACCAAACAAACAAAACAAAACCTCT

*****
3961 AGCGGTTTCACTCTTGTGCTCAGGCTGGANGGAGTGCAATGGCGCGATCTTGGCTTACT
    TCGCCAAAGTGAGAACAACGAGTCCGACCTNCCTCACGTTACCGCGCTAGAACCGAATGA

          ALU
*****
4021 GCAGCCTCTGCCTCCCAGGTTCAAGTGATTCTCCTGCTTCCGCCTCCCATTTGGCTGGGA
    CGTCGGAGACGGAGGGTCCAAGTTCACCTAAGAGGACGAAGGCGGAGGGTAAACCGACCTT

*****
4081 TTACAGGCACCCGCCACCATGCCAGCTAATTTTTGTATTTTGTAGTANANACNGGGGTG
    AATGTCCGTGGGCGGTGGTACGGGTGATTAAAAAACATAAAAAATCATNTNTGNCCCCAC

                                     A
=====
4141 GGGGTGGGGTTTACATGTTGGCCAAGCTGGTCTCGAACTTCTGAACTCAGATGATCCANC
    CCCCACCCCAAGTGTAACCGGTTTCAGCAGAGCTTGAAGACTTGAGTCTACTAGGTNG

          LU
=====
4201 TGCCTCTGCCTCCTAAAATTGCTGGGATTACAGGTGTNANCCACCATGCCCAACTCAAAA
    ACGGAGACGGAGGATTTTAACGACCCTAATGTCCACANTNGGTGGTACGGGTTGAGTTTT

```

## FIGUR 76

Seite 2

4261 TTTACTCTGTTTANAAACATCTGGGTCTAAGGTAGGAANCTCACCCCACTCAATTTTGT  
AAATGAGACAAATNTTTGTAGACCCAGATTCCATCCTTNGAGTGGGGTGAGTTAAAAACA

4321 GGTGTTTTTAAGCCAATNANAAAATTTTTTNATGTTGTTTNNNNNNNNNNNNNNNNNNNN  
CCACAAAATTTCGGTTANTNTTTTAAAAAANTACAACAAANNNNNNNNNNNNNNNNNNNN

4381 NNN  
NN

4441 NNN  
NN

4501 NNN  
NN

4561 NNN  
NN

4621 NNN  
NN

4681 NNN  
NN

4741 NNN  
NN

4801 NNN  
NN

4861 NNN  
NN

4921 NNN  
NN

4981 NNN  
NN

5041 NGCCANGRAGGGGGCCAGGTTCCAANTTCCCAACCKTTTTWGGARGGACNGCCCCAGGG  
NCGGTNCYTCCCCGGTCCAAGGTTNAAGGGTTGGMAAAAWCCTYCCTGNCGGGGGTCCC

5101 GGGGATRAACAGANTNGGGGKGGTWGGGTTNAKGGTGGAACNCCTTNGCGCCTGGAG  
CCCCAYTTGTCTNANCCCCMCCAWCCCAANTMCCACCCTTGNGGAANCGSCGGACCTC

5161 AACGTGCAAAGAGGAAATGAAGGGCCTGKGTCAAGGAGCCCAAGTNGGCGGGGAGTTTG  
TTGACGTTTCTCCTTTACTTCCCCGACMCAGTTCTCGGGTTCANCCGCCCCYTCAAAC

5221 CAGGGAGGCACTCCGGGGAGGTCCSGCGTGCCCGTCCAAGGGAGCAATGCGTCCTTCGGG  
GTCCCTCCGTGAGGCCCCCTCAGGSCGCACGGGCAGGTTCCCTCGTTACGCAGGAAGCCC

5281 TTCGTCCCCAWGCCGCTCTACGCGCCTYCCGTCTCCCTTCACGTTCCGGCATTCGTG  
AAGCAGGGGTWCGGCGCAGATGCGCGGARGGCAGGAGGGGAAGTGCAAGGCCGTAAGCAC

## FIGUR 76

Seite 3

5341 GTGCCCCGAGCCCCGACGCCCCGCGTCCGGACCTGGAGGCAGCCCTGGGTCTCCGGATCAG  
CACGGGCCTCGGGCTGCGGGGCGCAGGCCTGGACCTCCGTCGGGACCCAGAGGCCTAGTC

5401 GCCAGCGGCCAAAGGGTCGCGGCACGCACCTGTTCCAGGGCCTCCACATCATGGCCCCCT  
CGGTCGCCGGTTTCCAGCGGCGTGCGTGACAAAGGGTCCCGAGGTGTAGTACCGGGGA

5461 CCCTCGGGTTACCCACAGCCTAGGCCGGATTGACCTCTCTCCGCTGGGGCCCTCGCCT  
GGGAGCCCAATGGGGTGTCCGATCCGGCCTAAGCTGGAGAGAGGCGACCCCGGGAGCGGA

Sp1

\*\*\*\*\*

5521 GGCCTCCCTGCACCCTGGGAGCGCGAGCGGCGCGGGCGGGGAAGCGCGGCCCATACCC  
CCGACAGGACGTGGGACCCTCGCGCTCGCCGCGCGCCCGCCCCCTTCGCGCCGGGTATGGG

5581 CCGGGTCCGCCCCGAAGCAGCTGCGCTGTGCGGGCCAGGCCGGGCTCCAGTGGATTGCG  
GGCCCAGGCGGGCCTTCGTGACGCGACAGCCCCGGTCCGGCCCCGAGGGTCACCTAAGCG

Topo\_II\_ Spaltung

\*\*\*\*\*

5641 GGGCACAGACGCCCAGGACCGCGCTTCCACGTGGCGGAAGGACTGGGGACCCGGGCACC  
CCCGTGTCTGCGGGTCCTGGCGGAAGGGTGACCGCCTTCCTGACCCCTGGGCCCGTGG

E2F

\*\*\*\*\*

5701 CGTCCTGCCCCCTTCACCTTCCAGCTCCGCTTCTTCCGCGCGGACCCGGCCCCGTCCCGAA  
GCAGGACGGGGAAGTGGAAGGTCGAGGCGAAGAAGGCGCGCCTGGGCCGGGGCAGGGCTT

E

\*\*\*\*

5761 CCCTTCCAGGTCCCGGCCCAGCCCCCTTCGGGCCCTCCAGCCCCCTCCCTTCTTTT  
GGGAAGGGTCCAGGGCCGGGTGCGGGAAGGCCGGGAGGGTCGGGGAGGGGAAGGAAAAG

## FIGUR 76

Seite 4

```

                Spl
                =====
2F              NFkB              h
*****
5821 CGCGGCCCCCGCCCTCTCCTTCGCGGCGCGAGTTTCAGGCAGCGCTGCGTCTCTGCTGCGCA
    GCGCCGGGGCGGGAGAGGAAGCGCCGCGCTCAAAGTCCGTGCGGACGCAGGACGACGCGT
                                ^           ^
                                5860       5875
                                ECO47III   FSP1

TRT5'
*****>
5881 CGTGGGAAGCCCTGGCCCCGGCCACCCCGCGATGCCGCGCGCTCCCCGCTGCCGAGCCG
    GCACCCTTCGGGACCGGGGCCGGTGGGGGCGCTACGGCGCGCGAGGGGCGACGGCTCGGC

5941 TGCCTCCCTGCTGCGCAGCCACTACCGCGAGGTGCTGCCGCTGGCCACGTTCTGTGCGG
    ACGCGAGGGACGACGCGTGGTGATGGCGCTCCACGACGGCGACCGGTGCAAGCACGCCG
    ^
    5953
    FSP1

6001 GCCTGGGGCCCCAGGGCTGGCGGCTGGTGACGCGGGGACCGGGCGGCTTTCCGCGCGC
    CGGACCCCGGGGTCCCACCGCCGACCACGTGCGCCCCCTGGGCGCCGAAAGCGCGCG

6061 TGGTGGCCAGTGCCTGGTGTGCGTGCCCTGGGACGCACGGCCGCCCCCGCCGCCCT
    ACCACCGGGTCACGGACCACGCACGGGACCCTGCGTGCCGGCGGGGGCGCGGGGGA

                NFkB
                =====

                *****

6121 CCTTCGCGCAGGTGGGCCTCCCCGGGGTCGGCGTCCGGCTGGGGTTGAGGGCGGCCGGG
    GGAAGGCGGTCCACCCGGAGGGGGCCCCAGCCGACGGCCGACCCCAACTCCCGCCGGCCCC

                                Topo_II   Spaltung
                                :::::::::::
                                NFkB
                                =====

Intron1
*****>
6181 GGAACCAGCGACATGCGGAGAGCAGCGCAGGCGACTCAGGGCGCTTCCCCCGCAGGTGTC
    CCTTGGTTCGCTGTACGCCTCTCGTCCGCTCCGCTGAGTCCCGCAAGGGGGCGTCCACAG

ite
:

6241 CTGCCTGAAGGAGCTGGTGGCCCCGAGTGCTGCAGAGGCTGTGCGAGCGGGCGCGAAGAA
    GACGGACTTCCTCGACCACCGGGCTCACGACGTCTCCGACACGCTCGCGCCGCGCTTCTT

```

Figur 76  
Seite 5

6301 CGTGCTGGCCTTCGGCTTCGCGCTGCTGGACGGGGCCCCGCGGGGCCCCCCCCGAGGCCTT  
GCACGACCGGAAGCCGAAGCGCGACGACCTGCCCCGGGCGCCCCCGGGGGGGCTCCGGAA

6361 CACCACCAGCGTGCGCAGCTACCTGCCCAACACGGTGACCGACGCACTGCGGGGGAGCGG  
GTGGTGGTCGCACGCGTCGATGGACGGGTTGTGCCACTGGCTGCGTGACGCCCCCTCGCC

6372  
FSP1

6421 GGCCTGGGGGCTGCTGCTGCGCCGCTGGGCGACGACGTGCTGGTTACCTGCTGGCAGC  
CCGCA'CCCCGACGACGACGCGGCGCACCCGCTGCTGCACGACCAAGTGACGACCGTGC

6481 CTGCGCGCTCTTTGTGCTGGTGGCTCCAGCTGCGCCTACCAGGTGTGCGGGCCGCGCT  
GACGCGCGAGAAACACGACCACCGAGGGTCGACGCGGATGGTCCACACGCCCCGGCGCGA

6541 GTACCAGCTCGGCGCTGCCACTCAGGCCCCGGCCCCCGCCACACGCTAGTGACCCCGAAG  
CATGGTCGAGCCGCGACGGTGAGTCCGGGCGGGGGCGGTGTGCGATCACCTGGGGCTTC

6601 GCGTCTGGGATGCGAACGGGCCTGGAACCATAGCGTCAGGGAGGCCGGGGTCCCCCTGGG  
CGCAGACCCTACGCTTGCCCGACCTTGGTATCGCAGTCCCTCCGGCCCCAGGGGGACCC

6661 CCTGCCAGCCCCGGGTGCGAGGAGGCGCGGGGGCAGTGCCAGCCGAAGTCTGCCGTTGCC  
GGACGGTGGGGGCCACGCTCCTCCGCGCCCCCGTACGGTCGGCTTCAGACGGCAACGG

6721 CAAGAGGCCAGGCGTGCGCTGCCCCTGAGCCGGAGCGGACGCCCCGTTGGGCAGGGGTC  
GTTCTCCGGGTCCGCAACCGCGACGGGACTCGGCCTCGCCTGCGGGCAACCCGTCCCCAG

6781 CTGGGCCCCACCCGGGCAGGACGCGTGACCGAGTGACCGTGGTTTCTGTGTGGTGTACC  
GACCCGGGTGGGCCCCGTCTGCGCACCTGGCTCACTGGCACCAAAGACACACCAGTGG

6841 TGCCAGACCCGCCGAAGAAGCCACCTCTTTGGAGGGTGCGCTCTCTGGCACGCGCCACTC  
ACGGTCTGGGCGGCTTCTTCGGTGGAGAAACCTCCACGCGAGAGACCGTGCGCGGTGAG

6901 CCACCCATCCGTGGGCGGCCAGCACGCGGGCCCCCATCCACATCGCGGCCACCACG  
GGTGGGTAGGCACCCGGCGGTCTGCTGCGCCCCGGGGGTAGGTGTAGCGCCGGTGGTGC

6961 TCCCTGGGACACGCTTGTCCCCGGTGTACGCCGAGACCAAGCACTTCCTCTACTCCTC  
AGGGACCCTGTGCGGAACAGGGGGCCACATGCGGCTCTGGTTCTGTGAAGGAGATGAGGAG

7021 AGGCGACAAGGAGCAGCTGCGGCCCTCCTTCCTACTCAGCTCTCTGAGGCCAGCCTGAC  
TCCGCTGTTCTCTGTCGACGCCGGGAGGAAGGATGAGTCGAGAGACTCCGGGTGCGACTG

7081 TGGCGCTCGGAGGCTCGTGAGACCATCTTTCTGGGTTCCAGGCCCTGGATGCCAGGGAC  
ACCGCGAGCCTCCGAGCACCTCTGGTAGAAAGACCCAAGGTCCGGGACCTACGGTCCCTG

7141 TCCCCGAGGTTGCCCCGCTGCCCCAGCGCTACTGGCAAATGCGGCCCCCTGTTTCTGGA  
AGGGGCGTCCAACGGGGCGGACGGGGTCGCGATGACCGTTTACGCCGGGGACAAAGACCT

7167  
ECO47III

7201 GCTGCTTGGGAACCGCGCAGTGCCCCCTACGGGGTGCTCCTCAAGACGCACTGCCCCGT  
CGACGAACCCCTTGGTGCGCGTCACGGGGATGCCCCACGAGGAGTTCTGCGTGACGGGCGA

## FIGUR 76

Seite 6

7261 GCGAGCTGCGGTACCCCAGCAGCCGGTGTCTGTGCCCCGGGAGAAGCCCCAGGGCTCTGT  
CGCTCGACGCCAGTGGGGTCGTGCGCCACAGACACGGGCCCTCTTCGGGGTCCCGAGACA

7321 GGCGGCCCCGAGGAGGAGGACACAGACCCCGTCGCCTGGTGACGCTGCTCCGCCAGCA  
CCGCCGGGGCTCCTCCTCCTGTGTCTGGGGGACGCGGACCACGTCGACGAGGCGGTCTGT

7381 CAGCAGCCCCTGGCAGGTGTACGGCTTCGTGCGGGCCTGCCTGCGCCGGCTGGTGCCCCC  
GTCGTGCGGGACCGTCCACATGCCGAAGCACGCCCGGACGCGGCGGCCGACCACGGGGG

7441 AGGCCTCTGGGGCTCCAGGCACAACGAACGCCGCTTCCTCAGGAACACCAAGAAGTTCAT  
TCCGGAGACCCCGAGGTCCGTGTTGCTTGCGGCGAAGGAGTCCTTGTGGTTCTTCAAGTA

7501 CTCCCTGGGGAAGCATGCCAAGCTCTCGCTGCAGGAGCTGACGTGGAAGATGAGCGTGCG  
GAGGGACCCCTTCGTACGGTTCGAGAGCGACGTCCTCGACTGCACCTTCTACTCGCACGC

\*\*\*\*\*

7561 GGA CTGCGCTTGCTGCGCAGGAGCCCAGGTGAGGAGGTGGTGGCCGTCGAGGGCCCAGG  
CCTGACGCGAACCAGCGCTCCTCGGGTCCACTCCTCCACCACCGGCAGTCCCGGGTCC

7575

FSP1

Intron2

\*\*\*\*\*

7621 CCCCAGAGCTGAATGCAGTAGGGGCTCAGAAAAGGGGGCAGGCAGAGCCCTGGTCTCTCT  
GGGTCTCGACTTACGTCATCCCCGAGTCTTTTCCCCCGTCCGTCTCGGGACCAGGAGGA

\*\*\*\*\*

7681 GTCTCCATCGTCACGTGGGCACACGTGGCTTTTCGCTCAGGACGTCGAGTGGACACGGTG  
CAGAGGTAGCAGTGCACCCGTGTGCACCGAAAAGCGAGTCCTGCAGCTCACCTGTGCCAC

\*\*&gt;

7741 ATCGAGGTCGACTCTAGAGGATCCCCGGGTACCGAGCTCGAATTCTGTAATCATGGTCATA  
TAGCTCCAGCTGAGATCTCCTAGGGGGCCCATGGCTCGAGCTTAAGCATTAGTACCAGTAT

7747

SAL1